

PRMT6 als mögliches Ziel einer Therapie und seine Wirkung in der Hämatopoese

Vom Fachbereich Biologie der Technischen Universität Darmstadt
zur
Erlangung des akademischen Grades
eines *Doctor rerum naturalium*
(Dr. rer. nat.)

vorgelegte **Dissertation** von

MSc. Stefanie Carolin Herkt
aus Wetzlar

Erstgutachterin: Frau Prof. Dr. Beatrix Süß

Zweitgutachter: Herr Prof. Dr. Alexander Löwer

Herkt, Stefanie Carolin: PRMT6 als mögliches Ziel einer Therapie und seine Wirkung in der Hämatopoese
Darmstadt, Technische Universität Darmstadt,
Jahr der Veröffentlichung der Dissertation auf TUpriints: 2019
Tag der mündlichen Prüfung: 09.08.2018
Veröffentlicht unter CC BY-SA 4.0 International
<https://creativecommons.org/licenses/>

Inhaltsverzeichnis

Summary.....	1
Zusammenfassung.....	3
1 Einleitung.....	5
1.1 Hämatopoese.....	5
1.1.1 Erythropoese.....	7
1.1.2 Glykophorin A – Marker der Erythropoese.....	10
1.1.3 Megakaryopoese.....	11
1.2 Transkriptionsfaktoren in der Hämatopoese	14
1.3 Der Transkriptionsfaktor RUNX1	16
1.3.1 RUNX1 in der Hämatopoese	17
1.3.2 Isoformen und Domänenstruktur von RUNX1	19
1.3.3 RUNX1 in Leukämien.....	20
1.3.4 Die FAB-Klassifikation.....	21
1.3.5 RUNX1- interagierende Kofaktoren	22
1.4 Transkription und Chromatin	24
1.4.1 Chromatinorganisation	24
1.4.2 Histonmodifikationen	26
1.5 Protein-Arginin-Methyltransferasen (PRMT).....	27
1.5.1 Die Domänenstruktur der Protein-Arginin-Methyltransferasen.....	28
1.5.2 Mechanismus und Funktion der Arginin-Methylierung	30
1.5.3 Die Protein-Arginin-Methyltransferase 6 (PRMT6).....	32
1.5.4 PRMT6 und seine potentielle Rolle in der Krebsentstehung	33
1.5.5 <i>Crosstalk</i> zwischen Histonmodifikationen.....	34
1.6 Zielsetzung der Arbeit	36
2 Material und Methoden	38
2.1 Materialien	38
2.1.1 Chemikalien	38
2.1.2 Medien, Zusätze und Zytokine für die Zellkultur	39

2.1.3	Bakterienstämme und Medien.....	40
2.1.4	Verwendete Kits.....	40
2.1.5	Verwendete Geräte	41
2.2	Proteinbiochemische Methoden	43
2.2.1	Antikörper.....	43
2.2.2	Herstellung von Zellextrakten	45
2.2.3	XTT-Assay	46
2.2.4	Western Blot	46
2.2.5	Luciferase-Reportergen-Assay.....	48
2.2.6	Chromatin-Immunopräzipitation (ChIP)	49
2.2.7	Sequentieller ChIP (ChIP-ReChIP).....	52
2.3	Molekularbiologische Methoden	53
2.3.1	Herstellen von Vektoren	53
2.3.2	Polymerase-Kettenreaktion	57
2.3.3	Agarosegelelektrophorese	57
2.3.4	Aufreinigung von PCR-Produkten und von DNA aus Agarose-Gelen	58
2.3.5	Bestimmung der DNA-Konzentration.....	58
2.3.6	Ligation	58
2.3.7	Transformation von Bakterien	59
2.3.8	Kultivierung von Bakterien.....	59
2.3.9	Plasmidpräparation	60
2.3.10	Sequenzierung.....	60
2.3.11	RNA-Isolierung.....	61
2.3.12	Quantitative <i>real-time</i> -PCR.....	61
2.4	Zellbiologische Methoden.....	65
2.4.1	Kultivierung, Passagieren und Aufbewahrung von Zelllinien.....	65
2.4.2	Isolierung von primären hämatopoetischen Zellen	66
2.4.3	Kultivierung und Differenzierung humaner hämatopoetischer Stammzellen	67
2.4.4	Erstellung einer Wachstumskurve	69
2.4.5	Transfektion für die Herstellung lentiviraler Partikel.....	69

2.4.6	Ultrazentrifugation lentiviraler Partikel	70
2.4.7	Transduktion von Zelllinien und primären Zellen	70
2.4.8	Durchflusszytometrie.....	71
2.4.9	<i>Colony forming unit</i> -Assay	71
2.5	Methoden für das Arbeiten im murinen System	72
2.5.1	<i>Xenograft</i> -Experiment	72
2.5.2	Separation von Progenitorzellen aus dem Knochenmark	73
2.5.3	<i>Colony forming unit</i> - Assay von linien-depletierten Zellen	73
2.6	Auswertung	74
3	Ergebnisse.....	76
3.1	PRMT6 beeinflusst das Zellwachstum.....	76
3.2	PRMT6 ist in AML-Patienten-Proben exprimiert	79
3.3	PRMT6 beeinflusst Gene, die das Zellwachstum regulieren.....	82
3.4	<i>CDKN1B</i> ist ein direktes Zielgen von PRMT6.....	87
3.5	Neue PRMT6-Inhibitoren beeinflussen das Zellwachstum und die <i>CDKN1B</i> - Expression	91
3.6	PRMT6 inhibiert die Erythropoese.....	95
3.7	PRMT6 reprimiert das erythroide Genexpressionsprogramm	99
3.8	<i>GYPA</i> ist ein direktes Zielgen von PRMT6	105
3.9	Epigenetische Veränderungen sind mit der Differenzierung von hämatopoetischen Zellen assoziiert	108
3.10	Die Manipulation von PRMT6 in CD34+-Zellen hat einen Einfluss auf megakaryozytäre und erythroide Marker	112
3.11	Die pharmakologische Inhibition von PRMT6 erhöht die erythroide Genexpression	116
4	Diskussion.....	123
4.1	PRMT6 als mögliches Ziel einer Therapie	123
4.1.1	PRMT6 beeinflusst das Wachstum.....	124
4.1.2	PRMT6 ist in AML-Patienten-Proben exprimiert	125
4.1.3	PRMT6 beeinflusst Gene, die mit dem Zellwachstum assoziiert sind	127

4.1.4	PRMT6-Inhibitoren als möglicher Ansatzpunkt einer Leukämie-Therapie.....	130
4.2	PRMT6 beeinflusst die Differenzierung hämatopoetischer Zellen.....	132
4.2.1	PRMT6 beeinflusst die Erythropoese und das erythroide Genexpressionsprogramm	133
4.2.2	GYPA ist ein direktes Zielgen von PRMT6	134
4.2.3	Eine Inhibition von PRMT6 beeinflusst die erythroide Differenzierung	137
4.3	Ausblick.....	139
5	Literaturverzeichnis	141
6	Abkürzungsverzeichnis	172
7	Abbildungs- und Tabellenverzeichnis	175
7.1	Abbildungsverzeichnis.....	175
	Tabellenverzeichnis	177
8	Anhang.....	178
9	Publikationen und Posterpräsentationen	180
9.1	Publikationen.....	180
9.2	Posterpräsentationen	180
10	Lebenslauf	182
11	Danksagung.....	183
12	Ehrenwörtliche Erklärung.....	185

Summary

Adult hematopoiesis is orchestrated by a series of lineage fate decisions that ensure the differentiation of all mature blood cell types from pluripotent hematopoietic stem cells (HSCs). This process is guided by extrinsic factors, such as extracellular signals, cytokines and cell-cell-interactions or intrinsic factors, like transcription factors (Barreda & Belosevic, 2001; Cantor & Orkin, 2001; Cantor & Orkin, 2002; Goode et al, 2016; Orkin, 2000; Orkin & Zon, 2008). The interplay between transcription factors and epigenetic cofactors is important for hematopoietic gene expression control and decisive for lineage specification (Goldberg et al, 2007; Li, 2002). Lineage decisions are made at bipotential branching points where key transcription factors initiate cell type-specific gene expression programs. The transcription factor RUNX1 (runt related transcription factor 1) is considered as an important regulator of hematopoietic differentiation, as mutations or an aberrant expression of the *RUNX1* gene can cause defects in hematopoiesis, leading to acute myeloid leukemia (AML) or impaired megakaryocytic differentiation (Ichikawa et al, 2004; Sood et al, 2017). RUNX1 plays a key role at different stages, activating or repressing transcriptional targets through its DNA binding in association with other transcription factors or cofactors (Durst & Hiebert, 2004; Yamagata et al, 2005). This means the effect of RUNX1 on the expression of differentiation genes is dependent on its cofactors (Lausen, 2013). The protein arginine methyltransferase 6 (PRMT6) is an important corepressor associated with RUNX1 (Herglotz et al, 2013; Herkt et al, 2017; Kuvardina et al, 2015). PRMT6 is an epigenetic enzyme known for the establishment of the dimethylation of histone 3 at the arginine-residue 2 (H3R2me₂), which results in the repression of the transcription at its target genes (Guccione et al, 2007; Hyllus et al, 2007; Iberg et al, 2008). In addition, PRMT6 is overexpressed in different tumor entities and functions as an oncogene in breast cancer by promoting the tumor growth (Phalke et al, 2012; Yoshimatsu et al, 2011). Until now, a connection to leukemia has not been reported. In this study, the function of PRMT6 in hematopoietic differentiation and its potential role in acute myeloid leukemia was investigated.

Here, it was shown that the lentiviral knockdown of PRMT6 has an effect on the growth of leukemia cells in cell culture as well as in a xenograft mouse model. In order to connect these studies to human leukemia, the status of PRMT6 protein expression in patient samples was analyzed by immunostaining. It was revealed that PRMT6 is expressed in patients with acute myeloid leukemia (AML). Because RUNX1 can recruit PRMT6 to its target genes and is also associated with the progression of AML, common target genes were identified. Thereby target genes were identified which are involved in apoptosis, cell cycle regulation and cell growth. Out of those genes *CDKN1B*, an important cell cycle regulator, was verified as a common target gene from RUNX1 and PRMT6 in a chromatin immunoprecipitation assay. Because knockdown of PRMT6 inhibits cell growth, inhibition of PRMT6 represents a

potential strategy for an epigenetic therapy, similar to HDAC inhibitor treatment. Thus, it was tested if novel small molecule inhibitors of PRMT6 influence cell growth and gene expression of *CDKN1B*. In summary, PRMT6 would be a potential new target for an epigenetic leukemia therapy.

Because RUNX1 has also an effect on normal hematopoiesis, especially in the erythroid/megakaryocytic branching point and is known to interact with PRMT6, the effect of PRMT6 in the differentiation was investigated. In this dissertation, it was shown for the first time that PRMT6 inhibits erythroid gene expression during megakaryopoiesis of primary CD34+ progenitor cells. Through knockdown of PRMT6, the expression of several erythroid genes, such as *glycophorin A*, *ALAS2*, *AHSP*, *KLF1* and *β -globin* is increased. In detail, PRMT6 is recruited to erythroid genes, such as *glycophorin A*, during megakaryopoiesis. Consequently, a repressive histone modification pattern with high H3R2me2 and low H3K4me3 is established. The manipulation of PRMT6 through lentiviral overexpression or knockdown could influence the differentiation of primary cells to the megakaryocytic or erythroid direction. Importantly, inhibition of PRMT6 by small molecule inhibitors leads to upregulation of erythroid genes and promotes erythropoiesis. The findings reveal that PRMT6 plays a role in the control of erythroid/megakaryocytic differentiation and open up the possibility that manipulation of PRMT6 activity could facilitate enhanced erythropoiesis for therapeutic use.

The results in Chapter 3, in part, have been published in the Journal of the European Hematology Association in *haematologica* with the title “Protein arginine methyltransferase 6 controls erythroid gene expression and differentiation of human CD34+ progenitor cells” (2017). The dissertation author is the primary investigator and author of the manuscript.

Zusammenfassung

Die adulte Hämatopoese ist ein hierarchisch organisierter Prozess, der durch die Differenzierung von pluripotenten hämatopoetischen Stammzellen (HSC) zu jeglichen Zellen des Blutes gekennzeichnet ist. Während der Differenzierung kommt es zu einer Reihe von Linien-Entscheidungen, die durch extrinsische Faktoren, wie extrazelluläre Signale, Zytokine und Zell-Zell-Interaktionen oder durch intrinsische Faktoren, wie Transkriptionsfaktoren gesteuert werden (Barreda & Belosevic, 2001; Cantor & Orkin, 2001; Cantor & Orkin, 2002; Goode et al, 2016; Orkin, 2000; Orkin & Zon, 2008). Das Zusammenspiel der Transkriptionsfaktoren mit epigenetischen Kofaktoren ist wichtig für die hämatopoetische Genexpressionskontrolle und entscheidend für die Liniendifferenzierung (Goldberg et al, 2007; Li, 2002). Linienentscheidungen werden an Verzweigungspunkten der Differenzierung getroffen, an denen Transkriptionsfaktoren zelltypspezifische Genexpressionsprogramme initiieren können. Der Transkriptionsfaktor RUNX1 (runt related transcription factor 1) ist ein wichtiger Regulator der hämatopoetischen Differenzierung. Dies wird dadurch verdeutlicht, dass Mutationen oder eine aberrante Expression des *RUNX1*-Gens zu Defekten in der Hämatopoese und letztlich zu einer Leukämie oder zu einer beeinflussten megakaryozytären Differenzierung führen können (Ichikawa et al, 2004; Sood et al, 2017). RUNX1 bindet an die DNA seiner Zielgene und aktiviert oder reprimiert durch seine Assoziation mit anderen Transkriptionsfaktoren oder Kofaktoren die Genexpression (Durst & Hiebert, 2004; Yamagata et al, 2005). Das bedeutet die Wirkung von RUNX1 auf die Transkription von Differenzierungsgenen ist von seinen Kofaktoren abhängig (Lausen, 2013). Die Protein-Argininmethyltransferase 6 (PRMT6) ist ein wichtiger Korepressor, der mit RUNX1 assoziiert ist (Herglotz et al, 2013; Herkt et al, 2017; Kuvardina et al, 2015). PRMT6 ist ein epigenetisches Enzym, welches hauptsächlich für die Etablierung der Dimethylierung von Histon 3 am Arginin-Rest 2 (H3R2me2) bekannt ist, was zu einer Repression der Transkription führt (Guccione et al, 2007; Hyllus et al, 2007; Iberg et al, 2008). Zusätzlich ist PRMT6 in verschiedenen Tumorentitäten überexprimiert und wirkt wie ein Onkogen in Brustkrebs durch die Förderung des Tumorwachstums (Phalke et al, 2012; Yoshimatsu et al, 2011). Bis jetzt konnte jedoch noch keine Verbindung zur Leukämie gezeigt werden. Aus diesem Grund wurde in dieser Arbeit die Wirkung von PRMT6 in der hämatopoetischen Differenzierung und seine potentielle Rolle in der akuten myeloischen Leukämie (AML) untersucht.

Es konnte gezeigt werden, dass ein lentiviraler *Knockdown* von PRMT6 einen negativen Effekt auf das Wachstum einer Leukämie-Zelllinie, als auch einen inhibierenden Effekt auf das Tumorwachstum in einem *Xenograft*-Mausmodell hat. Um zu überprüfen, ob PRMT6 mit der Progression einer AML assoziiert sein könnte, wurde die Proteinexpression von PRMT6 in Patienten-Proben untersucht. Dabei konnte eine erhöhte Expression von PRMT6 in Patienten mit akuter myeloischer Leukämie gefunden werden. Da RUNX1 in der Lage ist PRMT6

zu seinen Zielgenen zu rekrutieren und ebenso mit der Progression einer AML assoziiert ist, sollten gemeinsame Zielgene gefunden werden. Dabei wurden Gene identifiziert, die in der Apoptose, der Zellzykluskontrolle und dem Zellwachstum involviert sind. Eines dieser Gene ist *CDKN1B*, welches ein wichtiger Zellzyklus-Regulator darstellt. Dieses Gen wurde als gemeinsames Zielgen von RUNX1 und PRMT6 durch eine Chromatin-Immunopräzipitation verifiziert. Da eine Herunterregulation von PRMT6 mittels *Knockdown* das Zellwachstum vermindert, könnte eine Inhibition von PRMT6 durch *small molecules* eine mögliche epigenetische Therapie darstellen. Ähnliche Therapien durch Inhibitoren gegen Histon-Deacetyltrasnferasen (HDACi) wurden schon erfolgreich eingesetzt (Marks & Xu, 2009). Aus diesem Grund wurden neue *small molecule*-Inhibitoren für PRMT6 getestet, die das Zellwachstum und die Genexpression von *CDKN1B* beeinflussen konnten. Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass PRMT6 ein potentielles neues Ziel für eine epigenetische Leukämie-Therapie darstellt.

Da RUNX1 ebenfalls eine Rolle in der normalen Differenzierung spielt, insbesondere in der erythroiden/megakaryozytären Entwicklung und außerdem mit PRMT6 interagieren kann, wurde die Rolle von PRMT6 in der Differenzierung näher untersucht. In dieser Dissertation konnte zum ersten Mal gezeigt werden, dass PRMT6 das erythroide Genexpressionsprogramm während der megakaryozytären Entwicklung von primären CD34+-Vorläuferzellen inhibiert. Durch eine Herunterregulation von PRMT6 wurde eine Erhöhung der Expression von verschiedenen erythroiden Genen, wie *Glykophorin A*, *ALAS2*, *AHSP*, *KLF1* und *β-Globin* erreicht werden. PRMT6 wird zu erythroiden Genen, wie *Glykophorin A* während der Megakayopoiese rekrutiert und etabliert ein repressives Histon-Modifikationsmuster. H3R2me2 nimmt an dem Promotor zu, während die aktive Histonmodifikation H3K4me3 abnimmt. Eine Manipulation von PRMT6 durch Überexpression oder *Knockdown* konnte außerdem die Differenzierung von CD34+-Zellen entweder in die megakaryozytäre oder erythroide Richtung begünstigen. Außerdem konnte eine Inhibition von PRMT6 durch *small molecules* zu einer Erhöhung der Expression von erythroiden Genen und schließlich zu einer verstärkten Erythropoese führen. Diese Ergebnisse zeigen, dass PRMT6 eine Rolle in der Kontrolle der erythroiden/megakaryozytären Differenzierung inne hat. Dies eröffnet die Möglichkeit einer Manipulierung der PRMT6-Aktivität, um eine verstärkte Erythropoese für therapeutische Zwecke zu erreichen.

Die Ergebnisse in Kapitel 3 wurden teilweise in der Zeitschrift „haematologica“ mit dem Titel „Protein arginine methyltransferase 6 controls erythroid gene expression and differentiation of human CD34+ progenitor cells“ (2017) veröffentlicht. Der Autor dieser Dissertation ist ebenfalls der Autor des veröffentlichten Manuskripts.

1 Einleitung

1.1 Hämatopoese

Als Hämatopoese wird der Prozess der Bildung aller Blutzellen aus pluripotenten Stammzellen bezeichnet. Da reife Blutzellen vorwiegend eine kurze Lebensdauer besitzen, muss täglich eine große Anzahl Blutzellen neu gebildet werden. Hämatopoetische Stammzellen (HSC) sind für die Aufrechterhaltung der zellulären Homöostase im Blutsystem zentral. Sie besitzen einerseits die Fähigkeit zur Selbsterneuerung, andererseits bleiben sie als Ursprungszellen differenzierter Vorläuferzellen erhalten, die sich dann weiter in die verschiedensten Zellen des hämatopoetischen Systems differenzieren können. So kann festgestellt werden, dass alle Blutzelltypen aus HSCs entstehen (Knapp et al, 1995; Weissman, 2000).

Die Hämatopoese beginnt in den ersten drei Wochen der embryonalen Entwicklung des Menschen, wenn der Embryo zu groß wird, um sich selbst mit Sauerstoff durch Diffusion zu versorgen. Anatomisch gesehen entstehen die ersten hämatopoetischen Zellen extra-embryonal im Dottersack (Kondo et al, 2003). Die definitive Hämatopoese beginnt dann in der Aorta-Gonaden-Mesonephros-Region (AGM-Region), wo anschließend die definitiven HSC gebildet werden (Dzierzak & Speck, 2008; Luis et al, 2012; Medvinsky & Dzierzak, 1996). Daraufhin wandern die Stammzellen weiter in andere Organe, wie Leber, Plazenta und Milz. Das Knochenmark wird dann kurz vor der Geburt von den HSCs besiedelt (Abbildung 1. 1). In adulten Säugern findet die Hämatopoese hauptsächlich im Knochenmark und nur ein geringer Teil als extramedulläre Hämatopoese in der Milz oder Leber, wenn die Bildung im Knochenmark durch Stress oder Infektionen gestört ist, statt (Mikkola & Orkin, 2006).

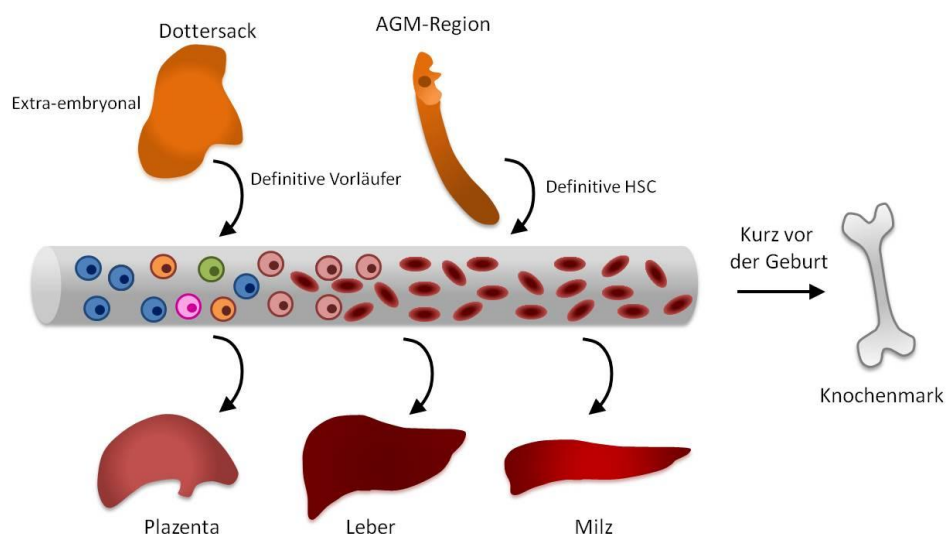


Abbildung 1. 1: Die Ontogenie der hämatopoetischen Zellen während der Entwicklung des Embryos. Die ersten hämatopoetischen Zellen entstehen extraembryonal im Dottersack. Die definitive Hämatopoese beginnt dann in der AGM-Region, wo die ersten definitiven hämatopoetischen Stammzellen gebildet werden. Darauffol-

gend wandern die Stammzellen in andere Organe, wie Plazenta, Leber und Milz aus. Kurz vor der Geburt wird dann das Knochenmark von den Stammzellen besiedelt, in dem dann später die adulte Hämatopoese fast ausschließlich stattfindet. Modifiziert nach Dzierzak and Philipsen (2013); Kim (2010).

Im adulten Knochenmark von Säugern sind nur wenige HSCs vorhanden. Dort führen sie die Spitze einer Hierarchie von Vorläuferzellen an, die sich dann fortlaufend in die einzelnen Linien differenzieren (Orkin, 2000). So wird die Zellidentität begonnen mit den HSCs kontinuierlich determiniert und das Differenzierungspotential der Vorläufer immer weiter herabgesetzt. Die Hämatopoese ist somit ein hierarchisch determinierter Prozess, bei dem ausgehend von den HSCs über mehrere Stadien von Progenitoren schlussendlich ausdifferenzierte und funktionsfähige Blutzellen entstehen (Rieger & Schroeder, 2012).

Nach phänotypischen und funktionellen Aspekten, werden HSCs in langzeit-repopulierende Stammzellen (*long-term* HSC, LT-HSC) und in kurzzeit-repopulierende Stammzellen (*short-term* HSC, ST-HSC) unterschieden. LT-HSC können sich ein Leben lang teilen und sich selbst erneuern, während ST-HSC sich nur begrenzt teilen können und dann differenzieren (Kondo et al, 2003; Luis et al, 2012; Pina & Enver, 2007). Aus LT-HSCs gehen ST-HSCs hervor, die dann multipotente Vorläuferzellen (*multipotent progenitors*, MPPs) bilden, deren Potential zur Selbsterneuerung eingeschränkt ist. Diese Zellen haben die Fähigkeit alle Zelltypen des Blutes zu bilden, können sich aber nicht selbst erneuern. Aus MPPs entstehen dann nach Differenzierung und Zellteilung myeloische Vorläuferzellen (*common myeloid progenitors*, CMP) und lymphoide Vorläuferzellen (*common lymphoid progenitors*, CLP). Das Differenzierungspotential dieser Zellen ist auf ihre jeweilige Linie begrenzt. Das bedeutet CLPs produzieren Zelltypen lymphoiden Ursprungs, wie T- und B-Zellen sowie natürliche Killerzellen und dendritische Zellen (Akashi et al, 1999). CMPs hingegen können sich in megakaryozytäre-erythroide Progenitorzellen (*megakaryocyte erythroid progenitors*, MEPs), sowie granulozytär-monozytäre Progenitorzellen (*granulocyte monocyte progenitors*, GMP) differenzieren. Diese Progenitoren produzieren adulte Zelltypen wie Erythrozyten, Megakaryozyten, Granulozyten und Monozyten/Makrophagen (siehe Abbildung 1. 2) (Akashi et al, 2000; Weissman, 2000). In akuten Situationen, wie während einer Anämie oder Infektion, können die Blutzellanzahlen rasch ansteigen. Die Zellzahl geht aber ebenso schnell wieder auf Normalwert zurück, nachdem sich das System wieder erholt hat (Rieger & Schroeder, 2012). Somit ist festzustellen, dass die Blutbildung ein hoch kompensatorisches System ist, welches eine große Bedeutung hat.

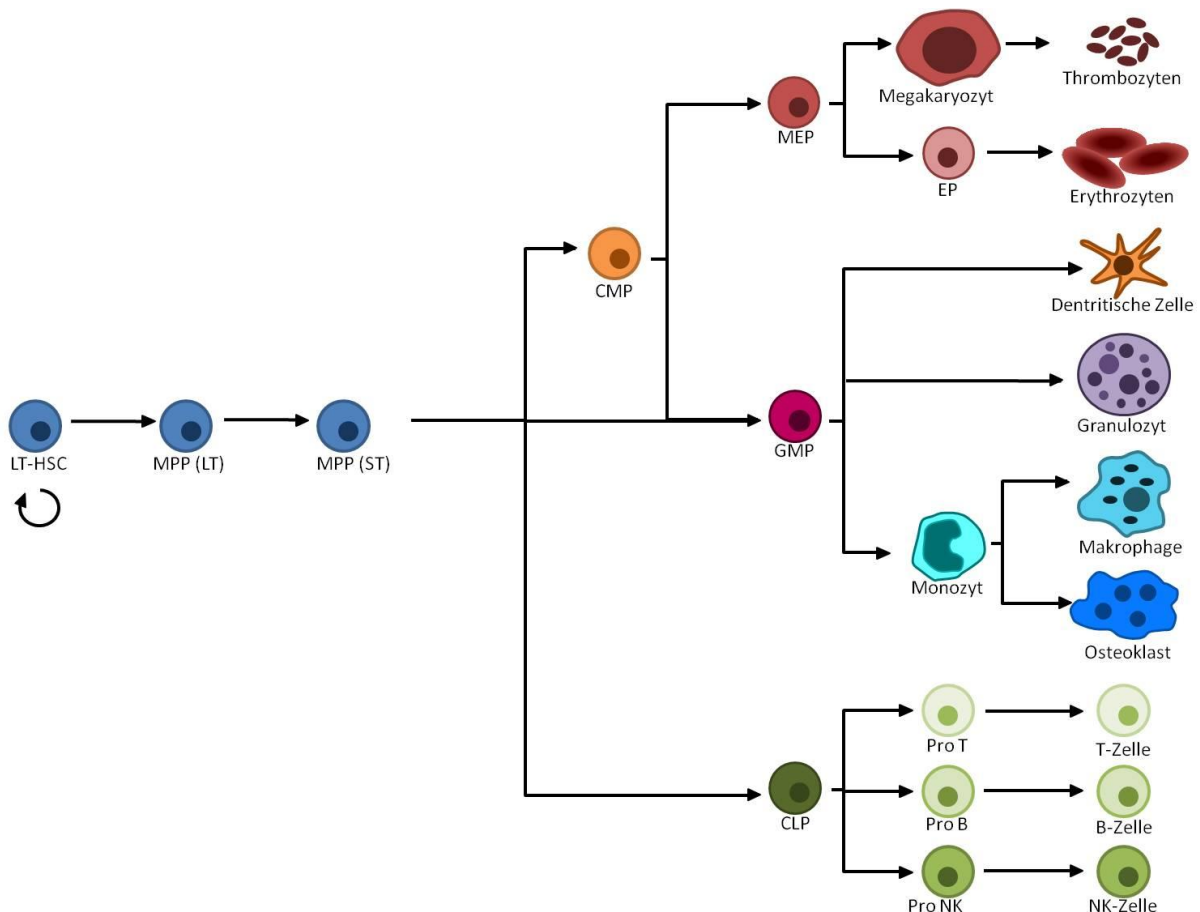


Abbildung 1. 2: Das hämatopoetische System. Hämatopoetische Stammzellen (HSCs) entwickeln sich zu multipotenten Progenitorzellen (MPPs), die wiederum myeloide (CMPs) und lymphoide Vorläuferzellen (CLPs) bilden können. Über weitere Vorläuferzellen werden alle reifen Zellen des hämatopoetischen Systems gebildet. Verändert nach Ferreira et al (2005).

HSC - hematopoietic stem cell, LT-HSC - long-term HSC, ST-HSC - short-term HSC, MPP - multipotent progenitor, CLP - common lymphoid progenitor, CMP - common myeloid progenitor, GMP - granulocyte-monocyte progenitor, MEP - megakaryocyte-erythroid progenitor EP – erythroider progenitor.

1.1.1 Erythropoese

Die Erythropoese bezeichnet den Prozess der Reifung der roten Blutkörperchen (Erythrozyten) aus Vorläuferzellen. In Säugetieren findet die definitive Erythropoese erst in der fötalen Leber durch Vorläuferzellen, die aus dem Dottersack migrieren, statt (Palis et al, 1999). In der fötalen Leber und im Knochenmark werden hämatopoetische Zellen von pluripotenten Stammzellen gebildet, die sich in verschiedene hämatopoetische Linien determinieren können. In der erythroiden Linienentscheidung sind die frühesten Vorläufer, die *ex vivo* identifiziert werden konnten, die langsam proliferierenden BFU-E (*burst forming unit-erythroid*).

Frühe BFU-E Zellen teilen und differenzieren sich aus dem reifen BFU-E Stadium zu den schnell teilenden CFU-E (*colony-forming unit-erythroid*) (Elliott et al, 2008). CFU-E Vorläufer

teilen sich drei bis fünf Mal über zwei bis drei Tage und differenzieren sich. Dabei unterziehen sie sich substantiellen Veränderungen, wie die Verringerung der Zellgröße, Chromatin-Kondensation und Hämoglobin-Bildung, welche dann zur Enukleation und zum Ausschluss anderer Organellen führen (Fawcett & Jensh, 1997). Im Detail teilen sich CFU-Es aktiv und bilden die ersten morphologisch definierten erythroiden Zellen, die Proerythroblasten (Tsiftoglou et al, 2009). Nach der Teilung der Proerythroblasten entstehen zunächst basophile Erythroblasten, die die erste Stufe des Erythroblasten-Stadiums darstellen. Ihre Zellkerne sind relativ klein, da es zur Chromatin-Kondensation kommt. Mit der weiteren Abnahme der Zellgröße (Kerngröße und Basophilie) kommt es zur Ausbildung der polychromatischen Erythroblasten. Diese können an den Polyribosomen Hämoglobin bilden. Im weiteren Verlauf mit der vermehrten Bildung von Hämoglobin kommt es zur Ausbildung des orthochromatischen Erythroblasten, bei dem sich der Zellkern noch weiter kondensiert und welcher schlussendlich im Retikulozyten-Stadium ausgestoßen wird (Fawcett & Jensh, 1997; Geminard et al, 2002). Die jungen Retikulozyten wandern aus dem Knochenmark in das periphere Blut und reifen dort mit dem Abbau weiterer Organellen zu Erythrozyten (siehe Abbildung 1. 3) (Koury et al, 2002). Jede Sekunde werden 2-3 Millionen Erythrozyten im Knochenmark gebildet und in den Blutkreislauf entlassen. Sie sind der häufigste Zelltyp im Blut. Erythrozyten haben eine kleine, runde, bikonkave Morphologie und einen Durchmesser von 6 µm. Ihre bikonkave Form begünstigt die Diffusion mit Sauerstoff, da die Oberfläche dadurch vergrößert wird (Dean, 2005). Die vorrangige Funktion dieser spezialisierten Zellen ist der Transport von Kohlenstoffdioxid und Sauerstoff, der durch das Hämoglobin in den Erythrozyten gebunden werden kann (Schmidt et al, 2011). In Menschen beträgt die Lebensdauer von Erythrozyten etwa 120 Tage, die schlussendlich von Makrophagen in der Milz und Leber abgebaut werden. Unter normalen Bedingungen werden jeden Tag etwa 1% aller Erythrozyten neu synthetisiert, jedoch kann die Erythrozytenbildung erheblich während akutem oder chronischem Stress, wie Traumata oder einer Hämolyse gesteigert werden (Elliott et al, 2009).

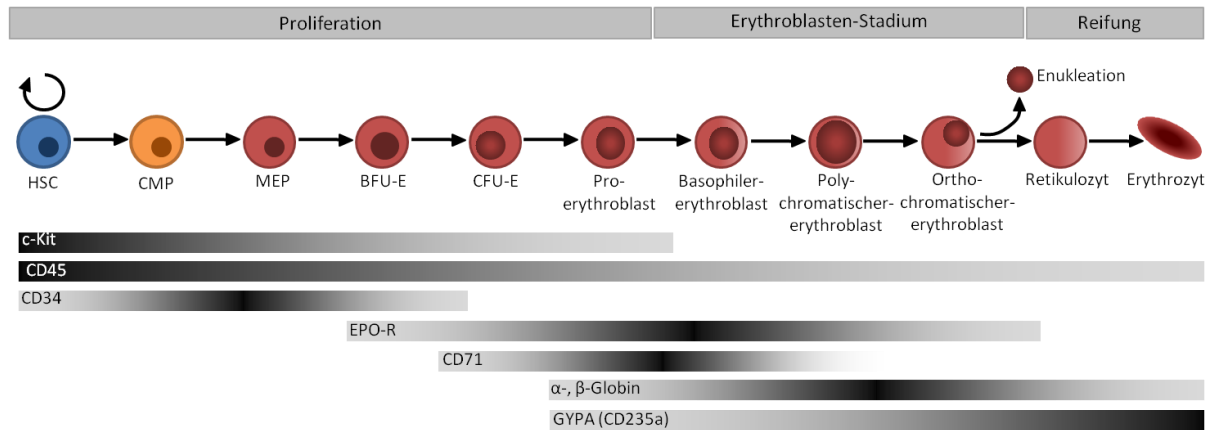


Abbildung 1. 3: Entwicklung der Erythrozyten. Während der Erythropoese differenzieren sich die HSCs über mehrere Vorläuferstufen zu reifen Erythrozyten. Die Differenzierung ist in drei Phasen gegliedert, der Proliferation, das Erythroblasten-Stadium und die Reifung, bei der aus dem Retikulozyt ein Erythrozyt entsteht. Während der Erythropoese finden Veränderungen in der Expression von Oberflächenmolekülen statt, die die verschiedenen Stadien charakterisieren. Die Marker der primitiven Vorläuferstadien c-Kit, CD45 und CD34 werden herunter reguliert. Hingegen ist die Expression von EPO-R und CD71 mit frühen erythroiden Vorläufern assoziiert und verringert sich wieder mit der Reifung der Erythroblasten. Die Expression von α - und β -Globin, sowie GYPA ist bis zur terminalen Differenzierung der Erythrozyten nachzuweisen. Verändert nach (Dzierzak & Philipsen, 2013).

HSC- *hematopoietic stem cell*, CMP - *common myeloid progenitor*, MEP - *megakaryocyte-erythroid progenitor*, BFU-E – *burst-forming units- erythroid cell*, CFU-E – *colony forming units-erythroid cell*.

Die Kurzzeit-Regulation der Erythropoese wird vornehmlich durch das, aus der Niere stammende, Zytokin Erythropoetin (Epo) kontrolliert. Dieses Zytokin wird unter hypoxischen (sauerstoffarmen) Bedingungen induziert und stimuliert die terminale Proliferation und Differenzierung von CFU-E Vorläufern (Elliott et al, 2009). Epo ist ein Glykoprotein und entfaltet seine Wirkung über die Bindung an den Epo-Rezeptor, dessen Expression verstärkt im BFU-E-Stadium hochreguliert wird (Klimchenko et al, 2009).

Durch die Bindung von Epo an den Rezeptor wird die JAK2/STAT5-Signalkaskade in Gang gesetzt, darauffolgend wird die Erythropoese verstärkt, indem die Proliferation und Differenzierung von erythroiden Vorläufern gefördert und Apoptose verhindert wird (Jelkmann, 2004; Spivak, 2005). Im Allgemeinen werden konstant neue Erythrozyten im Knochenmark produziert, welches eine Nische darstellt, die aus Endothelialzellen des vaskulären Systems, Osteoblasten, Stromazellen, hämatopoetischen Zellen und der extrazellulären Matrix besteht. Diese komplexe Nische ermöglicht den Zellen Kontakt zu anderen Zellen, Adhäsionsmolekülen, Wachstumsfaktoren und Zytokinen. Die frühen erythroiden Vorläufer reagieren auf bestimmte Zytokine, wie TPO (Thrombopoetin), GM-CSF (*granulocyte macrophage colony-stimulating factor*), IL-3 (Interleukin-3), IL-11 (Interleukin-11) und insbesondere auf SCF (*stem cell factor*). SCF bindet an den KIT-Rezeptor, welcher eine Tyrosinkinase darstellt, die über verschiedene Signalwege, wie der PI-3-Kinase (Phosphoinositid-3-Kinase), Src-Kinase (Tyrosinkinase Src) oder PLC- γ (*Phosphoinositide phospholipase C- γ*) wirken kann. In verschiedenen Stadien kann SCF synergistisch mit Epo in der Proliferation und Expansion von

erythroiden Vorläufern wirken und scheint auch eine Rolle in der Phosphorylierung des Epo-Rezeptors zu haben (Bunn, 2013; Wu et al, 1995).

Während der Erythropoese kommt es im Zuge der Differenzierung zur Veränderung der Oberflächenexpression auf der Zelle. Die Expression der Stammzellmarker CD34 und KIT wird nach dem BFU-E Stadium deutlich herunter reguliert. Anhand der sequentiellen Expression verschiedener Marker, wie CD45, CD235a und CD71 konnten Loken *et al.* 1987 verschiedene Entwicklungsstadien in der Erythropoese unterscheiden. HLe-1 (CD45) wird auf den frühesten identifizierbaren erythroiden Zellen exprimiert und seine Expression verringert sich mit zunehmender Differenzierung und wird in dem gereiften Erythrozyt schließlich nicht mehr exprimiert (Loken et al, 1987b). Die Expression des Transferrin-Rezeptors (CD71) beginnt im BFU-E Stadium und geht im späten Retikulozyten-Stadium schlussendlich verloren. Dieser Rezeptor vermittelt die Aufnahme des Eisen-Transferrin-Komplexes, welches für die Hämoglobin-Synthese benötigt wird und wird auf Zellen exprimiert, die Hämoglobin synthetisieren (Koury et al 2002). Die Transferrin-Rezeptor-Expression geht der Expression von Glykophorin A (CD235a) voran. Die Glykophorin A-Expression beginnt mit den morphologisch veränderten erythroiden Vorläufern, kurz nach dem CFU-E Stadium. Dies steht im Kontrast zu den Markern CD45 und CD71, welche fortlaufend während des Reifungsprozesses verloren gehen. Wenn Glykophorin A sein Maximum auf der Oberfläche erreicht hat, bleibt sein Expressionslevel bis zum reifen Erythrozyten Stadium konstant hoch (Loken et al, 1987a; Loken et al, 1987b). Zusammenfassend stellt CD71 einen Marker der frühen und CD235a der späteren Erythropoese bis hin zu den reifen Erythrozyten dar.

Weiterhin erfolgt mit der fortschreitenden Erythropoese die Hämoglobinsynthese. Das adulte Hämoglobin A1 (HbA1) ist ein tetrameres Protein und besteht aus vier Untereinheiten, zwei α - und zwei β -Ketten des Globins ($\alpha_2\beta_2$). Der Beginn der Hämoglobinsynthese lässt sich auf das Proerythroblasten-Stadium zurückführen, da dort die Expression der *Globin*-mRNA beginnt. Die *Globin*-mRNA ist sehr stabil, da auch noch genügend Hämoglobin während der terminalen Phase der Erythropoese, in der insgesamt die Proteinsynthese abnimmt, vorhanden sein muss (Wintrobe, 2009).

1.1.2 Glykophorin A – Marker der Erythropoese

Das Transmembranprotein Glykophorin A gehört zu der Familie der Glykoproteine, die an der Oberfläche von Erythrozyten exprimiert werden. Diese werden in zwei Gruppen eingeteilt GYPA, GYPB und GYPC, GYPD, die alle hoch glykolysierte N-terminale extrazelluläre, einzelne Membran-durchspannende und cytoplasmatische C-terminale Domänen besitzen. GYPA und GYPAB tragen die Antigene des MNS-Blutgruppensystems, welches momentan

43 Antigene beinhaltet (Blumenfeld & Huang, 1995). GYPA ist das am häufigsten vorkommende Sialoglykoprotein. Es besteht aus 131 Aminosäureresten, 70 liegen extrazellulär, 22 in der Membran und 39 cytoplasmatisch und hat ein Molekulargewicht von 36 kDa (Poole, 2000). In seinem nativen Zustand hat GYPA wenig oder keine Interaktion mit dem Membran-Zytoskelett. Die stark glykolysierte extrazelluläre Domäne beinhaltet 15 O-gebundene Glykane und ein N-gebundenes Glykan. In den Kohlenhydratketten der Glykophorine sind große Mengen an Sialinsäure enthalten, die vorwiegend für negative Ladung der Erythrozytenmembran verantwortlich sind. Folglich stellt die Minimierung der Zell-Zell-Interaktionen und die Verhinderung der Erythrozyten-Aggregation in der Zirkulation eine wichtige Funktion von GYPA dar (Auffray et al, 2001). Sialinsäure dient auch als ein Ligand für Viren, Bakterien und Parasiten. Da GYPA eine Hauptquelle für Sialinsäure darstellt und dieses entscheidend für den Eintritt von *plasmodium falciparum* in die Zelle ist, sind Zellen, die weniger GYPA haben mehr resistent als normale Zellen (Pasvol et al, 1982a; Pasvol et al, 1982b). Glykophorine tragen ebenso zu der Glykokalix, einer extrazellulären Matrix von Kohlenhydraten bei, die die Zelle vor mechanischen Schäden und mikrobiellen Angriffen schützt (Jentoft, 1990). Die seltene Glykophorin A-Defizienz hat keinen Phänotyp und ist nicht mit einer Krankheit assoziiert, da das dadurch resultierende Fehlen der Sialinsäure teilweise durch die Glykosylierung von Band 3 ausgeglichen werden kann (Poole, 2000). Band 3 und GYPA sind die häufigsten Integralproteine der Erythrozytenmembran.

1.1.3 Megakaryopoese

Die Megakaryopoese bezeichnet den Prozess der Bildung und Reifung der Megakaryozyten, die dann anschließend die Blutplättchen (Thrombozyten) bilden. Blutplättchen sind die zweit häufigsten Zelltypen im Blut und schützen die Blutgefäße vor Schäden. Wenn eine Verletzung auftritt initiieren sie die Blutgerinnung und tragen zur Reparatur der Gefäßwand bei, indem sie an das Endothel der Gefäßwand anheften, aggregieren und einen Thrombus ausbilden. Außerdem können durch die aktivierten Thrombozyten gerinnungsfördernde Substanzen freigesetzt werden (Angiolillo et al, 2010; Rossaint, 2004). Andererseits können sie auch Thrombosen verursachen, wenn eine Überproduktion stattfindet und/oder sie zu hyperaktiv sind (Tijssen & Ghevaert, 2013). Thrombozyten sind kernlos, haben einen Durchmesser von 1,5-3 μm und eine Lebensdauer von etwa 10 Tagen. Jeden Tag werden etwa 10^{11} Plättchen aus ihren Vorläufern, den Megakaryozyten, gebildet (Tijssen & Ghevaert, 2013). Wie in Abbildung 1. 4 gezeigt, stammen Megakaryozyten, wie alle Blutzellen von hämatopoetischen Stammzellen ab (Kaushansky, 2008). Diese determinieren sich weiter zu CMP, die sich wiederum in den bipotenten megakaryozytären erythroiden Vorläufer (MEP) diffe-

renzieren können. Der MEP-Vorläufer kann sich zu Megakaryozyten/Thrombozyten, als auch in Erythrozyten entwickeln. Als Antwort auf umgebungsbedingte Faktoren, Chemokinen und Zytokinen kann sich der bipotente MEP-Vorläufer anschließend in hoch teilungsfähige, frühe MK-*burst-forming unit* (BFU-Mk) und dann in die reiferen und kleineren CFU-Mk entwickeln, die beide noch CD34 exprimieren (Briddell et al, 1989). Aus diesen megakaryozytären Vorläufern können sich dann Megakaryoblasten bilden, die zwar ihre Teilungsfähigkeit verlieren, jedoch nicht die Fähigkeit der DNA-Replikation und der zytoplasmatischen Reifung (Patel et al, 2005; Richardson et al, 2005). In diesem Stadium kommt es zu einer mehrmaligen Teilung des Chromosomensatzes ohne Kern- und Zellteilung und das Volumen des Zytoplasmas nimmt stark zu (Jackson, 1990). Infolgedessen können diese Zellen einen Durchmesser von mehr als 50 bis 100 Mikrometer und eine Polyploidie von bis zu 128 N erreichen (Tomer et al, 1987; Tomer et al, 1988). Reife Megakaryozyten können Proplättchen formen, bevor diese dann die Blutplättchen freilassen können. Reife Megakaryozyten können im Knochenmark viele cytoplasmatische Verlängerungen ausbilden, die aus einer Stelle der MK-Plasmamembran entstammen. Diese Verlängerungen sind anfangs dick, verlängern und verdünnen sich jedoch anschließend und bilden komplexe, verzweigte Strukturen (Italiano et al, 1999). Der mehrlappige Zellkern bleibt in dem reifen Megakaryozyt vorhanden bis sich der ganze Mk-Zellkörper in Proplättchen gebildet hat (Machlus et al, 2014). Megakaryozyten, die sich direkt an Blutgefäßen befinden, strecken ihre Proplättchen-Fortsätze durch das Endothel der Blutgefäße. Von den Ausläufern können sich Thrombozyten abspalten und gelangen direkt in das Blut (Geddis et al, 2007; Geddis & Kaushansky, 2007). Ein Megakaryozyt kann tausende Thrombozyten hervorbringen (Deutsch & Tomer, 2006).

Die Megakaryopoese wird durch viele Faktoren gesteuert. Eine wichtige Rolle spielt dabei Thrombopoetin (TPO). TPO wird primär in der Leber exprimiert und in geringerem Maße in den Nieren, Knochenmark und anderen Organen (Kaushansky, 1999). TPO gehört zu der Zytokin-Familie mit vier-Helix-Bündel-Motiven, die Erythropoetin (EPO), G-CSF, Wachstumshormone und den Leukämie-hemmenden Faktor (LIF) einschließen. TPO und sein Rezeptor c-Mpl (*myeloproliferative leukemia virus oncogene*, auch CD110) sind entscheidend für das Wachstum und die Entwicklung von Megakaryozyten. Wenn im Mausmodell TPO oder sein Rezeptor (c-Mpl) fehlen, reduziert sich die Anzahl der Megakaryozyten und Plättchen auf etwa 10% des normalen Wertes (Bunting et al, 1997; Gurney et al, 1994). Zusätzlich zu megakaryozytären Zellen exprimieren HSCs auch c-Mpl (Thrombopoetin Rezeptor) und sind abhängig von der TPO-Signalübertragung für ihre Erhaltung und Expansion (Fox et al, 2002). C-Mpl hat keine intrinsische Kinase-Aktivität, stattdessen ist dieser Rezeptor mit der zytoplasmatischen Tyrosinkinase Jak2 (Janus-Kinase 2) assoziiert (Drachman & Kaushansky, 1995). Das bedeutet, wenn TPO an seinen Rezeptor bindet wird der Jak/STAT-Signalweg aktiviert und die Proliferation und die Differenzierung von megakaryozytären Vor-

läuferzellen, sowie die Reifung von Megakaryozyten mit der einhergehenden Thrombozytenbildung stimuliert (Kirito & Kaushansky, 2006). TPO aktiviert während der Megakaryozyten-Differenzierung auch die Expression charakteristischer Oberflächenproteinen, wie CD61/41 (GPIIb/IIIa) und CD42 (GPIb) (Kaushansky et al, 1994).

Während der megakaryozytären Differenzierung werden mit jedem Differenzierungs-Stadium andere Oberflächenmoleküle exprimiert. So kann der bipotente MEP-Vorläufer durch ein Muster von Oberflächen-Markern bestimmt werden, da sie die Marker IL7-R α ⁻, Lin⁻, cKIT⁺, Sca-1⁻, CD34⁻, FcR γ ^{low} exprimieren. Wenn die Zellen sich dann in die megakaryozytäre Richtung differenzieren kommt es zur Expression von CD41 (GPIIb) und CD61 (GPIIIa), CD42 (GPIb) und Glykoprotein V (Hodohara et al, 2000). Das Glykoprotein CD41 bildet mit dem CD61-Antigen den Fibrinogenrezeptor der anschließend Fibrinogen und Fibrin binden kann. Dadurch ist dieser Rezeptor an der Zelladhäsion, Thrombozytenaktivierung und der Aggregation beteiligt (Coller, 1990; Shattil et al, 1998; Vainchenker et al, 1982). Dieser Rezeptor ist in der megakaryozytären Linie von den Vorläufern bis hin zu den Blutplättchen exprimiert und der Expressionslevel steigt mit der Reifung der Zellen (Carrell et al, 1985). Ein weiteres Oberflächenmolekül, das während der megakaryozytären Differenzierung exprimiert wird ist CD42b. Die Expression von CD42 setzt etwas später als CD41 ein und ist eher auf reiferen Megakaryozyten zu finden (Debili et al, 2004).

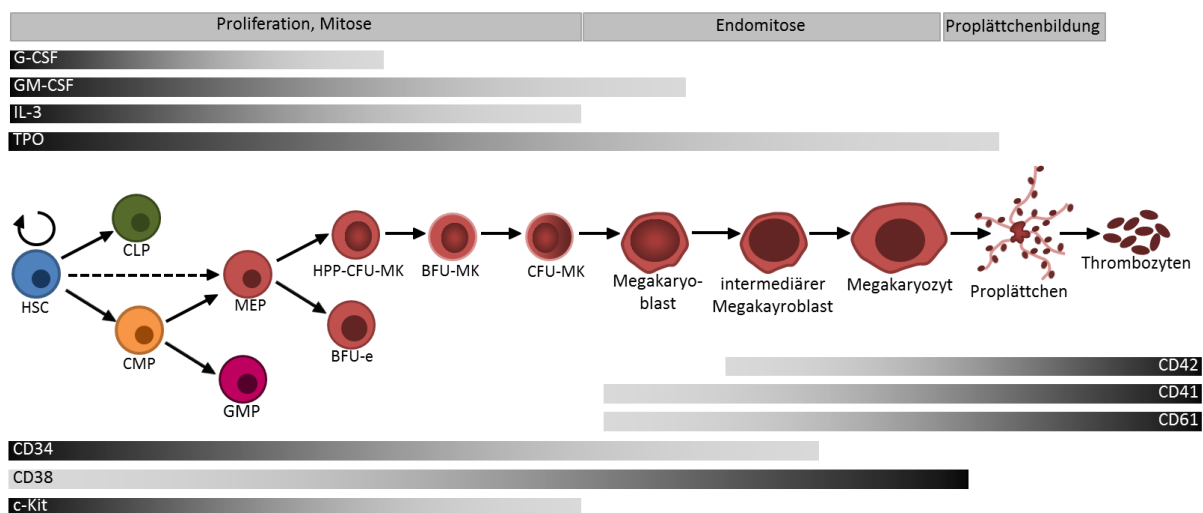


Abbildung 1. 4: Entwicklung der Thrombozyten. Im Zuge der Megakaryopoese entwickeln sich die HSCs zu reifen Megakaryozyten und bilden schlussendlich Thrombozyten. Die Entwicklung erfolgt über mehrere Vorläuferstadien. Der reife Megakaryozyt bildet Pseudopodien (Proplättchen) aus denen dann die Thrombozyten ins Blut abgegeben werden können. Die Entwicklung der Thrombozyten ist in drei Phasen gegliedert, der Proliferation und Mitose, der Endomitose und der Proplättchenbildung. Verändert nach Chang et al (2007).

HSC- *hematopoietic stem cell*, CLP - *common lymphoid progenitor*, CMP - *common myeloid progenitor*, GMP - *granulocyte-monocyte progenitor*, MEP - *megakaryocyte-erythroid progenitor*, BFU-E – *burst-forming units- erythroid cell*, BFU-Mk – *burst-forming units- megakaryocyte*, CFU-Mk – *colony forming units- megakaryocyte*

1.2 Transkriptionsfaktoren in der Hämatopoese

Hämatopoetische multipotente Stammzellen teilen sich im Laufe der Hämatopoese in verschieden differenzierte Zellen des Blutes (siehe Kapitel 1.1.). Dieser Prozess geht mit der Annahme linienspezifischer Eigenschaften und dem Verlust des Differenzierungspotenzials einher. Diese hämatopoetischen Linienentscheidungen werden durch ein Zusammenspiel von intrinsischen Faktoren, wie Transkriptionsfaktoren und extrinsischen Faktoren, wie extrazelluläre Signale, Zytokine und Zell-Zell-Interaktionen vorangetrieben. Diese vermitteln eine zelltypspezifische Genexpression und bestimmen Linienentscheidungen während der terminalen Differenzierung. So sind Transkriptionsfaktoren wichtig für den Erhalt der hämatopoetischen Stammzellen, aber auch für die spätere linienspezifische Expression von Genen verantwortlich (Barreda & Belosevic, 2001; Cantor & Orkin, 2001; Cantor & Orkin, 2002; Goode et al, 2016; Orkin, 2000; Orkin & Zon, 2008). Somit unterscheiden sich die verschiedenen Zellen des Blutes durch ihre unterschiedliche linienspezifische Genexpression, die sich dann in eine unterschiedliche Proteinexpression niederschlägt (Miyamoto et al, 2002). Für die Regulation der Genexpression ist ebenso die Bindungsaffinität von Transkriptionsfaktoren an DNA-Sequenzen, die relative Konzentration in der Zelle, das Vorhandensein freier DNA-Bindestellen, die Anwesenheit verschiedener Isoformen, Kofaktoren, sowie posttranslationale Modifikationen entscheidend (Barreda & Belosevic, 2001; Tootle & Rebay, 2005). Transkriptionsfaktoren können dabei sowohl verstärkend, als auch vermindern auf die spezifische Genexpression wirken. Sie sind DNA-bindende Proteine, die die Aktivität von Genen initiieren und regulieren können (Maston et al, 2006). Durch das ENCODE-Projekt konnten genom-weit viele solche Proteine beschrieben werden, wobei ein Teil dieser Proteine eine spezifische Funktion in der normalen und malignen Hämatopoese besitzt (Wang et al, 2012a).

Transkriptionsfaktoren sind pleiotrop, da sie in verschiedenen Zellen in verschiedenen Entwicklungsstufen oder Differenzierungsstufen verschiedene Rollen einnehmen können. Diese Pleiotropie ist anhand des Transkriptionsfaktors SCL/TAL1 (*T-cell acute lymphocytic leukemia 1*) gut zu erläutern. TAL1 ist für die Spezifizierung des Mesoderms und schlussendlich bei der Entwicklung der hämatopoetischen Zellen erforderlich. Wenn dann die Hämatopoese begonnen hat, interagiert TAL1 mit anderen Transkriptionsfaktoren und fördert die Differenzierung in reifenden myeloiden Zellen. Eine Dysregulation der Expression von TAL1 in T-Zell-Progenitoren führt hingegen zu einer Entwicklung von T-Zell akuter lymphoblastischer Leukämie (T-ALL), da in diesen Zellen normalerweise keine Expression von TAL1 vorhanden ist (Hall et al, 2003; Mikkola et al, 2003; Porcher et al, 2017).

Transkriptionsfaktoren, die eine Linien-beschränkte Expression haben, spielen also eine große Rolle in der Hämatopoese (Orkin, 2000). Unter den am besten untersuchten Faktoren gehören zum Beispiel PU1 (*transcription factor, binds to PU-box*), CEBP α (*CCAAT/enhancer-binding Protein α*), RUNX1 (*runt-related transcription factor 1*), GATA-1 (*GATA binding protein 1*), c-myb (*proto-oncogene C-Myb*) und auch TAL1. Der *Knockout* eines dieser Gene, welches für einen dieser Faktoren kodiert resultiert in schwerwiegende hämatopoetische Defekte. Darüber hinaus wurde gezeigt, dass diese Transkriptionsfaktoren wichtige Zielgene regulieren und dadurch direkt Vorläuferzellen in ihrer Differenzierung beeinflussen (Tenen et al, 1997). Eine Vielzahl dieser Transkriptionsfaktoren hat eine Rolle in der HSC Funktion, was durch *knockout*- und *knockin*-Studien verdeutlicht werden konnte. Es konnte gezeigt werden, dass zum Beispiel TAL1, RUNX1, MLL (*mixed-lineage leukemia*), LMO2 (*LIM domain only 2*), LDB1 (*LIM domain binding 1*), GATA2 (*GATA binding protein 2*) und PU.1 wichtig für die Selbsterneuerung und Entstehung der hämatopoetischen Stammzellen sind (Ferreira et al, 2005; Orkin, 2000; Orkin & Zon, 2008) (siehe Abbildung 1. 5). Andere Faktoren, wie PU.1, GATA1, FOG1 (*friend of GATA protein 1*), FLI1 (*Fli-1 proto-oncogene, ETS transcription factor*), GFI1b (*growth factor independent 1B transcriptional repressor*), KLF1 (*kruppel like factor 1*) aber auch TAL1 und RUNX1, sind entscheidend für die Linienspezialisierung. Bei der Differenzierung von Erythrozyten und Megakaryozyten aus dem gemeinsamen Vorläufer MEP sind einige Transkriptionsfaktoren beteiligt, die für die Entwicklung beider Linien essentiell sind (GATA1, FOG1, Tal1, Gfi1b, NFE2 (*nuclear factor, erythroid 2*)) und andere die nur für eine Linie spezifisch sind (Elagib et al, 2003; Goldfarb, 2007; Goldfarb, 2009). Dabei zählt KLF1 zu den erythroiden, während RUNX1 und FLI1 zu den megakaryozytären Transkriptionsfaktoren zählen (Goldfarb, 2007; Orkin & Zon, 2008; Wickrema & Crispino, 2007).

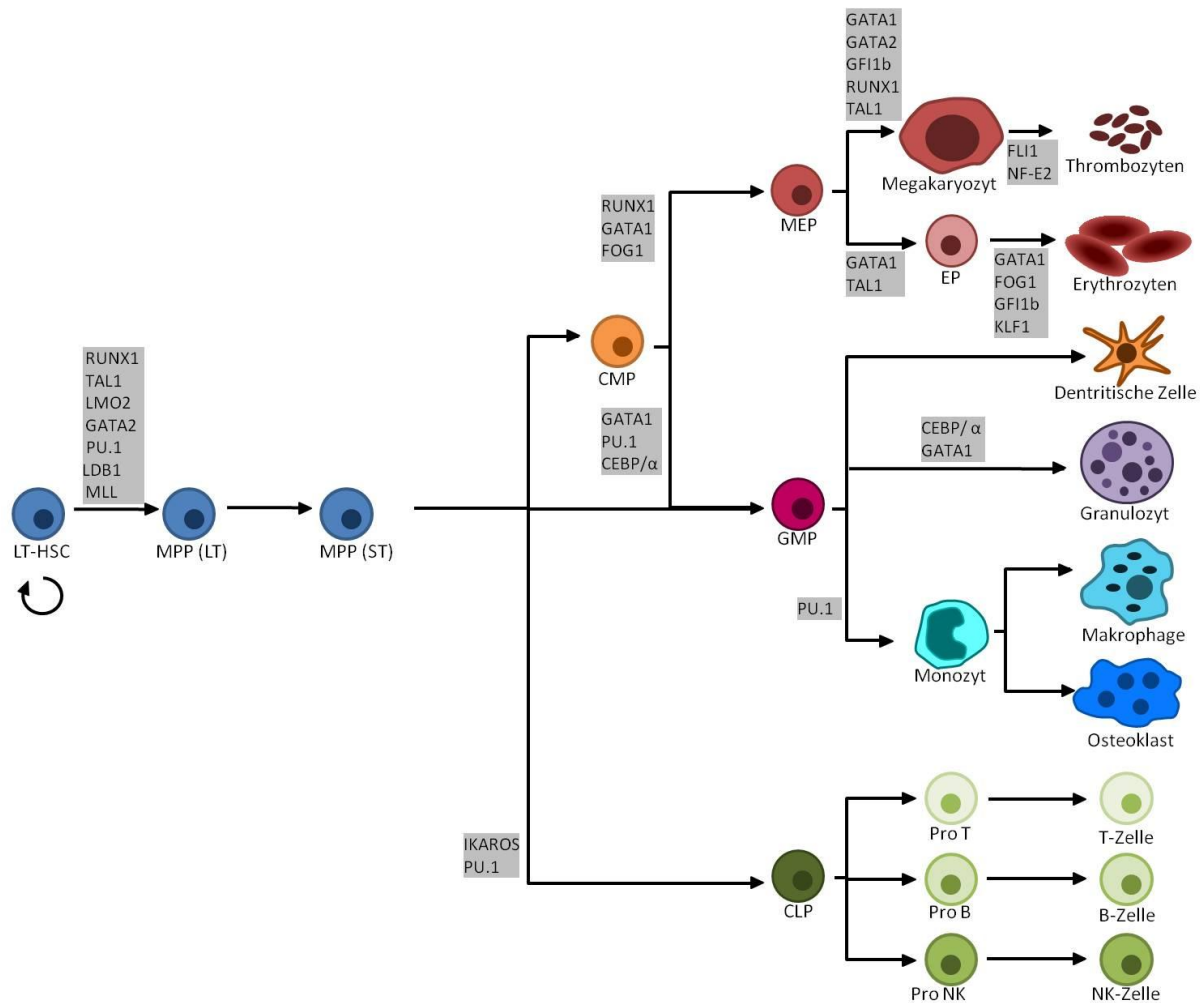


Abbildung 1. 5: Transkriptionsfaktoren in der Hämatopoese. Während der Differenzierung von HSCs zu ausdifferenzierten Zellen sind unter anderem, auch Transkriptionsfaktoren von großer Bedeutung. Hämatopoetische multipotente Stammzellen determinieren sich im Laufe der Hämatopoese über verschiedene Progenitoren in verschiedenen differenzierten Zellen des Blutes. Transkriptionsfaktoren vermitteln eine zelltypspezifische Genexpression und bestimmen so Linienentscheidungen während der terminalen Differenzierung. Somit können sie ebenso wichtig für den Erhalt der hämatopoetischen Stammzellen, aber auch für die spätere Linien-spezifische Expression von Genen sein.

HSC - hematopoietic stem cell, LT-HSC - long-term HSC, ST-HSC - short-term HSC, MPP -multipotent progenitor, CLP - common lymphoid progenitor, CMP - common myeloid progenitor, GMP -granulocyte-monocyte progenitor, MEP - megakaryocyte-erythroid progenitor EP – erythroider Progenitor.

1.3 Der Transkriptionsfaktor RUNX1

Runx1 (Runx-related transcription factor 1) (RUNX1), auch bekannt als *acute myelogenous leukemia 1* (AML1), wurde initial durch die chromosomale Translokation in Chromosom 21 (t(8;21)(q22;q22)) entdeckt, die sehr häufig in akuter myeloischer Leukämie (AML) vorkommt (Miyoshi et al, 1991). Runx1 wurde zunächst im murinen System als Faktor beschrieben, der Sequenz-spezifisch an *Enhancer* des Moloney murinen Leukemia-Virus und Polyoma-Virus bindet und wurde dann als *core binding factor* dargestellt. Aus diesen Eigenschaften ergeben

sich die anderen Namen für RUNX1, wie PEBP2aB (*polyomavirus enhancer binding protein 2aB*) und CBFA2 (*core-binding factor subunit alpha 2*) (Kamachi et al, 1990; Speck & Baltimore, 1987). Durch die Homologie zu dem Transkriptionsfaktor *run1* in *Drosophila* wurde die Nomenklatur geändert und die Proteine, die eine *run1*-Domäne besitzen, zur *run1-related protein*, also der RUNX-Familie zusammengefasst (van Wijnen et al, 2004). In Säugern gibt es drei RUNX-Proteine (RUNX1, RUNX2, RUNX3), die hoch konserviert sind und strukturelle Ähnlichkeiten aufweisen, was für eine konservierte Rolle dieser Faktoren in grundlegenden biologischen Prozessen spricht (Levanon & Groner, 2004; Rennert et al, 2003; Sullivan et al, 2008). In Säugern wurde RUNX1 zunächst als entscheidender Regulator in der Hämatopoese, RUNX2 für seine Rolle in der Knochenentwicklung und RUNX3 für seine Bedeutung in der Neurogenese beschrieben (Komori et al, 1997; Levanon et al, 2002; Okuda et al, 1996; Otto et al, 1997; Wang et al, 1996a). Allerdings wurde allen drei Faktoren später auch eine Rolle in anderen Organ-Systemen zugesprochen. Es konnte gezeigt werden, dass nicht nur RUNX1, sondern auch RUNX2 und RUNX3 in dem Prozess der Hämatopoese mitwirken (Blyth et al, 2010; de Bruijn & Dzierzak, 2017; Liakhovitskaia et al, 2010; Lotem et al, 2015).

1.3.1 RUNX1 in der Hämatopoese

Runx1 ist sowohl in der primitiven, als auch in der definitiven Hämatopoese von Bedeutung. In der primitiven Hämatopoese ist Runx1 im Mesoderm ab Tag E7.5 in der Maus exprimiert und bleibt während der Differenzierung der Blutinseln des Mesoderms erhalten, bis es zur Ausbildung von primitiven Erythrozyten kommt (North et al, 1999). Zunächst wurde beschrieben, dass primitive Erythrozyten für ihre Entstehung kein Runx1 benötigen, da sich diese Zellen auch in *Runx1-null* Embryonen bilden können (Okuda et al, 1996). Es konnte jedoch von Yokomizo und Kollegen (2008) gezeigt werden, dass RUNX1 für die Reifung von primitiven Erythrozyten benötigt wird, da diese sonst morphologische Defekte aufweisen und die Expression des erythroiden Markers Ter119 (assoziiert mit Glykophorin A), sowie der Transkriptionsfaktoren EKLF und Gata1 verringert ist (Wang et al, 1996b; Yokomizo et al, 2008).

Weiterhin ist Runx1 essentiell für die Ausbildung aller anderen hämatopoetischen Zellen, die im Dottersack ab E8 bis E8.5 produziert werden (Cai et al, 2000; Niki et al, 1997; Okuda et al, 1996; Sasaki et al, 1996; Wang et al, 1996b). Diese Zelltypen entstehen vermutlich aus einem speziellen Bereich des Endotheliums im Dottersack während des Übergangs des homogenen Endotheliums zur Hämatopoese. Wenn kein Runx1 vorhanden ist, ist dieser Prozess im Embryo (EHT = *endothelial-to-hematopoietic transition*) blockiert (North et al, 1999; Yokomizo et al, 2001). So akkumulieren sich Runx1^{-/-}-ES-Zellen im HE-Stadium und bilden

sich nicht aus (Lancrin et al, 2009). Außerdem konnte gezeigt werden, dass Runx1-defiziente Mäuse keine definitive Hämatopoese in der fötalen Leber aufweisen und embryonal letal bei E12.5, aufgrund nicht vorhandener HSCs, sind (Okuda et al, 1996; Wang et al, 1996b).

In der adulten Hämatopoese ist RUNX1 konstitutiv in allen Linien exprimiert, außer in reifen erythroiden Zellen und ist dort für die hämatopoetische Entwicklung entscheidend (Lorsbach et al, 2004; North et al, 2004). Ein konditioneller *Knockout* von Runx1 in adulten Mäusen führt zu Störungen in der Megakaryopoese, sowie in der B-Zell- und T-Zell-Differenzierung, jedoch nicht zum Versagen des hämatopoetischen Systems. Somit ist Runx1 für den Erhalt von HSCs in der adulten Maus nicht essentiell (Gowney et al, 2005; Ichikawa et al, 2004; Putz et al, 2006). Jedoch konnte gezeigt werden, dass RUNX1 für die Reifung von Megakaryozyten und die Produktion von Thrombozyten in der adulten Hämatopoese von Nöten ist. Der Phänotyp äußerte sich in Megakaryozyten, die sehr klein waren und bei denen die Polyploidie und die Abgrenzung der Membranen beeinflusst waren. Dies führte zu einer starken aber nicht letalen Thrombozytopenie in Mäusen (Ichikawa et al, 2004).

Interessanterweise konnten RUNX1-Mutationen auch im humanen System mit einer seltenen familiären Thrombozytenstörung assoziiert werden, die eine Prädisposition zur Ausbildung von AML besitzen (FPD/AML, FPD = *familial platelet disorder*). Betroffene Patienten entwickeln eine Neigung leicht zu bluten, eine starke Thrombozytopenie mit normal großen Blutplättchen und manchmal Defekte in der Funktion der Blutplättchen (Dowton et al, 1985). Obwohl RUNX1 für die Reifung von Megakaryozyten von Bedeutung ist, konnten seine Zielgene wegen der geringen Anzahl von Megakaryozyten im Knochenmark nur schwer identifiziert werden. Es konnten gegenwärtig p19^{INK4D}, NR4A3, ALOX12 und Gene für die Myosinschwere-Kette (*myosin heavy chain genes*, wie MYL9 und MYH10) als mögliche Zielgene von RUNX1 in Megakaryozyten identifiziert werden. Diese Zielgene sind in der Entwicklung der Mehrkernigkeit, der Endomitose und der Bildung der 12-Hydroxy-Eicosatetraensäure beteiligt (Antony-Debre et al, 2012; Bluteau et al, 2011; Bluteau et al, 2012; Gilles et al, 2008; Kaur et al, 2010; Lordier et al, 2012).

Durch die Bindung von RUNX1 an seine Konsensus-Sequenz, kann es außerdem die Expression verschiedener anderer hämatopoetischer Zielgene, wie den Zytokin-Rezeptor M-CSFR, T-Zell- und B-Zellrezeptoren, IL-3, GM-CSF, c-mpl und Differenzierungsmoleküle (wie CD41, Myeloperoxidase, Neutrophil-Elastase), aber auch Transkriptionsfaktoren (wie PU.1, GFI1, GFI1b) regulieren (Cameron et al, 1994; Herglotz et al, 2013; Huang et al, 2008; Lancrin et al, 2012; Lauzurica et al, 1997; Michaud et al, 2003; Nuchprayoon et al, 1994; Satoh et al, 2008; Takahashi et al, 1995; Zhang et al, 1994).

1.3.2 Isoformen und Domänenstruktur von RUNX1

Das *RUNX1*-Gen umspannt etwa 261 kb und ist auf dem langen Arm des Chromosom 21q22 lokalisiert. Es besteht aus 10 Exons (Exon1-6, 7A, 7B, 7C und 8) und seine Expression wird durch zwei Promotoren gesteuert. Der distale und der proximale Promotor können in verschieden gespleißte Varianten resultieren. Die drei häufigsten Isoformen von RUNX1 sind RUNX1a, RUNX1b und RUNX1c (siehe Abbildung 1. 6). RUNX1a, mit 250 Aminosäuren und RUNX1b, welches aus 453 Aminosäuren besteht, teilen die gleiche N-terminale Region und sind das Ergebnis alternativen *Splicens* (Miyoshi et al, 1995). RUNX1a fehlt die transkriptionelle regulatorische Domäne, die in den anderen beiden Isoformen C-terminal vorhanden ist (Tanaka et al, 1995). RUNX1c besteht aus 480 Aminosäuren und ist die längste Isoform, die vom distalen Promotor transkribiert wird. RUNX1a und RUNX1b werden vom proximalen Promotor transkribiert. Außerdem haben RUNX1b und RUNX1c die gleiche C-terminale Region.

Alle drei Isoformen besitzen eine *runt*-Domäne, die sich N-terminal befindet. Die *runt*-Domäne umfasst 128 Aminosäuren, die hoch konserviert sind. Der Name *runt* ergibt sich aus der großen Ähnlichkeit mit dem *runt*-Gen von *Drosophila melanogaster*, welches wichtig in der Embryogenese ist. Die *runt*-Domäne vermittelt die DNA-Bindung und die Interaktion mit dem Heterodimerisierungspartner, *core-binding factor beta* (CBF β), welcher selber keine DNA binden kann. Die Heterodimerisierung von RUNX1 und CBF β erhöht die Bindungsaffinität von RUNX1 zur DNA (Ogawa et al, 1993a; Wang et al, 1993). Kristallstrukturanalysen dieses Komplexes zeigten, dass CBF β allosterisch mit RUNX1 agiert und die DNA-Binddefähigkeit stabilisiert (Bartfeld et al, 2002; Tahirov et al, 2001; Warren et al, 2000). Neben CBF β interagiert die *runt*-Domäne auch mit anderen Transkriptionsfaktoren, wie GATA1, C/EBP α oder PU.1, aber auch mit Kofaktoren, die eine epigenetische Funktion besitzen, wie in Kapitel 1.3.5 beschrieben.

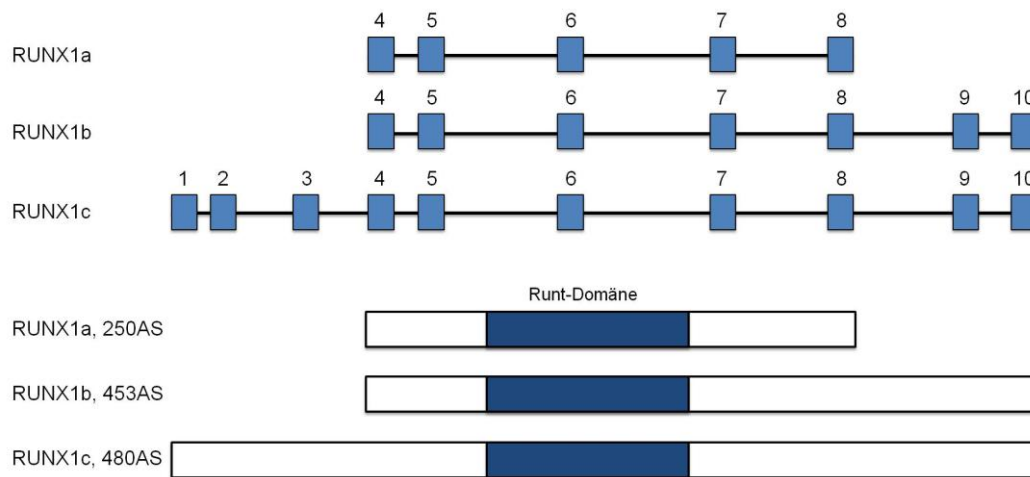


Abbildung 1. 6: RUNX1-Isoformen. Das RUNX1-Gen kodiert für drei verschiedene Isoformen (RUNX1a, RUNX1b, RUNX1c). RUNX1a besteht aus Exon 4-8 und ist mit 250 Aminosäuren die kleinste Isoform von RUNX1. RUNX1b besteht aus Exon 4-10 und besteht aus 453 AS, während RUNX1c Exon 1-10 enthält und das Protein eine Größe von 480 AS besitzt. Alle Isoformen besitzen eine *runt*-Domäne, die wichtig für die DNA-Bindung ist (in dunkelblau dargestellt). Erstellt nach Miyoshi et al (1995).

1.3.3 RUNX1 in Leukämien

Die Bedeutung des Transkriptionsfaktors RUNX1 in der Hämatopoese wird auch durch die Mutationen deutlich, die in dem *RUNX1*-Gen in verschiedenen hämatologischen Krankheiten vorkommen.

RUNX1-Mutationen wurden zunächst in Leukämien als chimäre Gene entdeckt, die durch chromosomale Translokationen entstanden, wie t(8;21), t(3;21) und t(16;21). Anschließend konnten auch RUNX1-Mutationen in Patienten mit myeloiden Krankheiten gefunden werden, die einen normalen Karyotyp hatten. Dabei handelte es sich entweder um eine akute myeloische Leukämie (AML) mit FAB-Klassifikation M0 (siehe Kapitel 1.3.4) oder um Patienten mit einem myelodysplastischen Syndrom (MDS) (Imai et al, 2000; Osato et al, 1999). In den FAB M0 AMLs wurden in mehr als 40% der Fälle RUNX1-Mutationen gefunden (Dicker et al, 2007). Außerdem konnten RUNX1-Punktmutationen in Patienten mit einer myeloproliferativen Neoplasie, die in eine AML resultieren kann, gefunden werden (Ding et al, 2009). Zusammenfassend ist RUNX1 eines der Gene, welches am häufigsten in AML mutiert ist.

Die chromosomale Translokation t(8;21) führt zu dem Fusions-Protein RUNX1-ETO, auch bekannt als RUNX1-RUNX1T1 oder AML-MTG8. Dieses Fusionsprotein reprimiert die Funktion des normalen RUNX1 in der Hämatopoese (Meyers et al, 1995). Diese Repression der RUNX1-Funktion konnte auch für die chromosomalen Translokationen t(3;21) und t(6;21) gezeigt werden, die in die Fusionsproteine AML1-EVI1 und AML1-MTG16 resultieren. Alle

diese Mutanten beinhalten noch die *runx*-Domäne von RUNX1, ihnen fehlt jedoch der C-Terminus, der für die RUNX1-Funktion notwendig ist. Insbesondere ist für RUNX1-ETO bekannt, dass es die Expression von myeloid-spezifischen Genen reprimiert und deswegen zu einer Inhibierung der Reifung von myeloiden Zellen kommt (Ahn et al, 1998; Kohzaki et al, 1999). Das RUNX1-ETO-Fusionsprotein ist in der Lage Korepressoren zu rekrutieren und führt dann zu der Reprimierung von RUNX1-Zielgenen (Meyers et al, 1995). RUNX1-ETO konnte bis jetzt in 12% der AML- und 40% der M2-AML-Patienten gefunden werden. Weniger häufige chromosomale Translokationen, die mit RUNX1 assoziiert sind, konnten auch in Patienten mit einer Leukämie, wie der akuten lymphoblastischen Leukämie (ALL) oder anderen hämatologischen Krankheiten gefunden werden (Chan et al, 2005; Golub et al, 1995; Mikhail et al, 2002). Die verschiedenen Leukämien, ob myeloiden oder lymphoiden Ursprungs, in denen RUNX1 involviert ist, deuten auf seine Rolle als Masterregulator der Hämatopoese hin.

Neben den chromosomalen Translokationen konnte eine Studie zeigen, dass ebenso Mutationen in der *runx*-Domäne bei AML-Patienten vorkommen. Weiterführende Analysen machten deutlich, dass manche dieser Mutationen zu einer anormalen DNA-Bindung führen, die die Transaktivierung des M-CSF-Promotors (ein Zielgen von RUNX1) verhindert (Osato et al, 1999). Weiterhin sind RUNX1-Mutationen auch mit MDS assoziiert. Dabei sind wiederum viele Mutationen mit der *runx*-Domäne assoziiert, die nachfolgend die DNA-Bindung beeinflussen oder die Interaktion mit Kofaktoren, wie zum Beispiel CBF β verändern (Bejar et al, 2011; Imai et al, 2000). Außerdem konnten in manchen chronisch myeloiden Leukämien (CML) auch Mutationen im C-Terminus festgestellt werden, jedoch lagen die meisten Mutationen hier auch in der *runx*-Domäne (Kuo et al, 2009). Andere Mutationen im C-Terminus führten zu einer Leserasterverschiebung, die dann in der Entstehung eines Stoppcodons und schließlich in einer verkürzten Form von RUNX1 resultiert (Harada & Harada, 2009).

1.3.4 Die FAB-Klassifikation

Die FAB-Klassifikation ist ein System zur Einteilung von akuten Leukämien, wie der myeloiden und lymphatischen Leukämie. Eine Leukämie kann diagnostiziert werden wenn mindestens 30% Myeloblasten das Knochenmark ausmachen. FAB steht für *French-American-British* und wird wegen der Ausarbeitung dieses Systems von Hämatopathologen, die aus Frankreich, Großbritannien und USA stammen, so bezeichnet. Die moderne Diagnostik beruht auf einer Kombination von zytochemischer und morphologischer Befunde ergänzt durch die Zytogenetik und molekulare Diagnostik. Die FAB-Nomenklatur klassifiziert die Subtypen

der AML aufgrund der Zellen des normalen Knochenmarks, dem die Blastenzellen am ähnlichsten sind. Das bedeutet aber nicht, dass sich das leukämische Ereignis nur auf die Linie bezieht die morphologisch am meisten im Knochenmark repräsentiert ist (Pollock et al, 2003). Zum Beispiel konnten Fialkow und Kollegen zeigen, dass in weiblichen Patienten mit einem X-chromosomalen Polymorphismus der Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase eine Involvierung von myeloiden aber nicht erythroiden oder megakaryozytären Vorläufern in manchen Patienten zu finden war (Fialkow et al, 1981). Im Folgenden werden die verschiedenen Leukämie-Subtypen tabellarisch dargestellt (siehe Tabelle 1. 1).

Tabelle 1. 1: Tabellarische Darstellung der FAB-Klassifikation. Der FAB-Subtyp (M0, M1, M2, M3, M4, M5a, M5b, M6, M7), die Bezeichnung und die zytogenetische Aberration werden dargestellt.

FAB-Subtyp	Bezeichnung	Zytogenetische Aberrationen
M0	Akute myeloische Leukämie mit minimaler Differenzierung	
M1	Akute myeloische Leukämie ohne Ausreifung	
M2	Akute myeloische Leukämie mit Ausreifung	t(8;21)
M3	Akute progranulozytäre Leukämie	t(15;17)
M4	Akute myelomonozytäre Leukämie oder Akute myelomonozytäre Leukämie mit Eosinophilie (M4Eo)	inv(16)
M5a oder b	Akute Monoblasten-Leukämie (a) oder Akute Monozyten-Leukämie (b)	
M6	Akute Erythroleukämie	
M7	Akute Megakaryoblasten-Leukämie	

1.3.5 RUNX1- interagierende Kofaktoren

Während frühere Studien RUNX1 eher als transkriptionellen Aktivator beschrieben haben, der durch die Bindung von anderen Kofaktoren die Promotoraktivität verstärkt, konnte RUNX1 auch als transkriptioneller Repressor identifiziert werden (Durst & Hiebert, 2004; Petrovick et al, 1998; Wotton et al, 1994). Somit ist die Wirkung von RUNX1 auf seine Zielgene stark von der Zusammensetzung der transkriptionellen Komplexe abhängig. Diese Komplexe beinhalten ebenso transkriptionelle Kofaktoren, sowie epigenetische Modifizierer, die zu Promotoren oder regulatorischen Regionen rekrutiert werden. Somit kann RUNX1 sowohl die transkriptionelle Aktivität, als auch den epigenetischen Status von Zielgenen beeinflussen. Es konnte gezeigt werden, dass RUNX1 mit epigenetischen Modifizierern interagiert und abhängig von der Balance der Koaktivatoren oder Korepressoren zu einer be-

stimmten Zeit aktivierend oder reprimierend auf seine Zielgene wirken kann. RUNX1 interagiert zum Beispiel mit den Histon-Acetyltransferasen p300 (Histon-Acetyltransferase p300) und CBP (*CREB binding protein*), welche die RUNX1-abhängige transkriptionelle Aktivierung der Zielgene, wie GM-CSF verstärkt (Kitabayashi et al, 1998; Oakford et al, 2010). Durch Lichtinger und Kollegen (2012) konnte in genom-weiten Studien gezeigt werden, dass RUNX1-Bindung mit einer erhöhten Histon-Acetylierung assoziiert ist und dadurch die Bindung von anderen Transkriptionsfaktoren, wie TAL1 und FLI1 an ihre Zielgene beeinflusst wird. Das zeigt eine RUNX1-abhängige Rekrutierung von acetylierenden Komplexen, die den epigenetischen Status von RUNX1-Zielgenen beeinflussen (Oakford et al, 2010). Außerdem wird RUNX1 selbst von Acetyltransferasen modifiziert. Zum Beispiel kann p300 RUNX1 acetylieren und somit seine DNA-Bindung verstärken (Yamaguchi et al, 2004). Eine Methylierung von RUNX1 durch die PRMT1 (Protein-Arginin-Methyltransferase 1) erhöht die transkriptionelle Aktivität, da es die Interaktion mit dem mSin3a-Korepressor-Komplex (*SIN3 transcription regulator family member A*) zerstört (Zhao et al, 2008). Im Gegensatz dazu kann die Methylierung von RUNX1 durch die Protein-Arginin-Methyltransferase 4 (PRMT4) zu einer Initiierung eines Multiprotein-Repressor-Komplexes führen, der auch DPF2 (*Double PHD Fingers 2*) enthält (Vu et al, 2013). Außerdem kann die Histon-Methyltransferase SUV39H1 (*suppressor of variegation 3-9 homolog 1*) mit RUNX1 interagieren und führt zu einer herabgesetzten DNA-Bindung, die dann wiederum in eine Verminderung der transkriptionellen RUNX1-Aktivität auf dem Promotor resultiert (Chakraborty et al, 2003; Reed-Inderbitzin et al, 2006). Die Zusammensetzung der RUNX1-Komplexe kann auch direkt durch zelluläre Signalkaskaden beeinflusst werden, bei denen ERK RUNX1 phosphoryliert und auch die Interaktion mit Sin3a stört und seine Transaktivierung verstärkt (Imai et al, 2004; Tanaka et al, 1996). Ebenso kann eine Phosphorylierung von RUNX1 durch CDK (Cyclin-abhängige Kinasen) die Interaktion zu HDAC1 (Histon-Deacetylase 1) und HDAC3 (Histon-Deacetylase 3) inhibieren und dadurch seine Transaktivierungsaktivität erhöhen (Guo & Friedman, 2011).

Die genannten Veröffentlichungen zeigen RUNX1 als Ziel von epigenetischen Modifizierern, welche post-transkriptionell das RUNX1-Protein modifizieren, dadurch seine Koaktivatoren/Korepressoren-Interaktionen verändern und dann seine transkriptionelle Aktivität beeinflussen. Zusätzlich rekrutiert RUNX1 aber auch diese Koaktivatoren oder Korepressoren zu seinen Zielgenen, was in eine Veränderung der Chromatin-Umgebung und somit letztendlich auch die Genaktivität auf anderer Ebene beeinflusst. Ein Beispiel für solch eine Veränderung des Chromatins für RUNX1 ist die Interaktion mit der PRMT6 (Protein-Arginin-Methyltransferase 6). PRMT6 ist Teil des repressiven Komplexes mit Sin3a und HDAC1 und etabliert die Dimethylierung des Histons 3 (H3R2me2a), die die aktivierende Histonmodifika-

tion H3K4me3 inhibiert. Auf diesen Wirkmechanismus von PRMT6 wird genauer in Kapitel 1.5.5 eingegangen.

1.4 Transkription und Chromatin

In Eukaryoten ist die DNA dicht verpackt und liegt im Zellkern als Chromatin vor. Jedoch muss die DNA schnell zugänglich für die Transkription sein, um biologische Prozesse steuern zu können. Somit sind der Grad der Verpackung und die dynamische Organisation des Chromatins ein wichtiger Teil der Genregulation.

1.4.1 Chromatinorganisation

In Eukaryoten ist die genetische Erbinformation in einer komplexen Struktur aus DNA und Proteinen dem sogenannten Chromatin, organisiert. Das Chromatin ist die höchste Organisationsform der DNA. Die kleinste Einheit des Chromatins ist das Nukleosom, welches aus einem Histonoktamer besteht, um welches 147 bp DNA gewunden ist. Histone sind stark basische Moleküle, die etwa eine Größe von 11-14 kDa haben und evolutionär stark konserviert sind. Das Histonoktamer besteht aus jeweils zwei Molekülen von *core*-Histonen, aus H2A, H2B, H3 und H4 (Luger et al, 1997). Das Histon H1 bindet an die freie DNA (*Linker*-Region) zwischen den Nukleosomen und bestimmt somit den Nukleosomenabstand. Die 11 nm Faser stellt die DNA dar, die periodisch um wiederholende Einheiten von Nukleosomen verpackt ist (siehe Abbildung 1. 7). Das Histon H1 vermittelt dann die Organisation der Nukleosomen zu einer höheren Form der Chromatin-Organisation (30 nm Faser), indem es die benachbarten Nukleosomen miteinander verbindet. Die 300-700 nm Faser entsteht durch weitere Schleifenbildung und Faltung und erhöht den Verpackungsgrad. Das 1,5 µm kondensierte Chromosom stellt die am stärksten verpackte Form des Chromatins dar, welches nur während der nukleären Zellteilung (Mitose oder Meiose) erscheint.

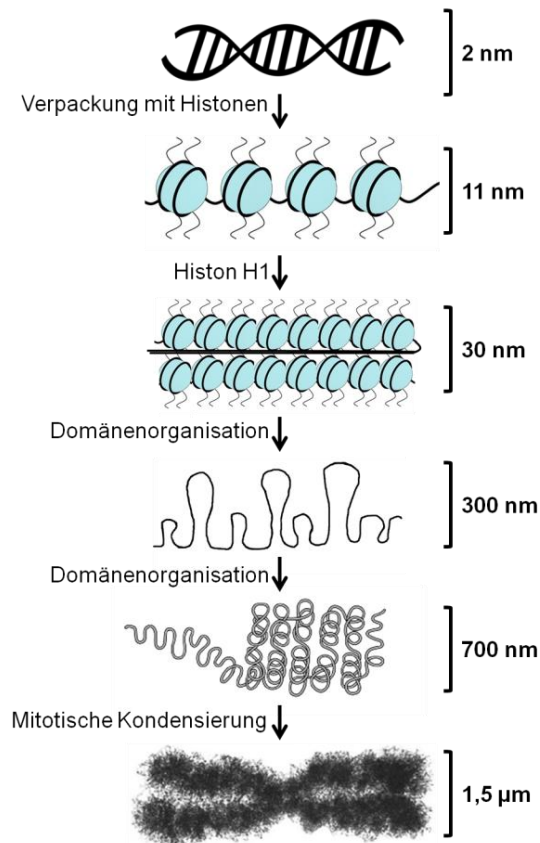


Abbildung 1. 7 Die Chromatinorganisation. Das Chromatin kann in verschiedene Konfigurationen eingeteilt werden. Der DNA-Strang (2nm) ist um Histone gewunden. Um ein Histon sind etwa 147bp DNA gewickelt, wodurch die 11nm- Konfiguration entsteht. Histon H1 vermittelt dann die Organisation der 30nm-Faser, indem es die Linker-Regionen miteinander verknüpft. Durch weitere Domänenorganisation entsteht dann die 300nm- und 700nm-Faser und der Verpackungsgrad erhöht sich. Das 1,5 um kondensierte Chromatin stellt die am stärksten verpackte Form dar. Verändert nach (Allis et al, 2007a)

Das Chromatin ist eine Organisationsform der DNA, welche in verschiedenen Konfigurationen vorkommt. Historisch gesehen wurde das Chromatin entweder in Euchromatin oder Heterochromatin klassifiziert, was noch von der Färbung der DNA mit bestimmten Farbstoffen stammt. Dabei ist Euchromatin das dekondensierte Chromatin, welches jedoch transkriptionell aktiv oder inaktiv sein kann. Heterochromatin kann weitestgehend als sehr stark verpackt und als stillgelegtes Chromatin charakterisiert werden. Heterochromatin kommt als konstitutives Heterochromatin, bei dem Gene in jedem Zelltyp des Organismus nur selten transkribiert werden oder als fakultatives Heterochromatin vor. Bei dem fakultativen Chromatin werden Gene in manchen Zellen in einem bestimmten Zellzyklus oder Entwicklungsstufe exprimiert und sind ansonsten transkriptionell inaktiv (Allis et al, 2007b). Der Verpackungsgrad des Chromatins kann durch verschiedene Prozesse beeinflusst werden, wie DNA- und Histonmodifikationen oder auch dem Chromatin-*Remodeling* und nicht-kodierenden RNAs (Du & Patel, 2014; Sarda & Hannenhalli, 2014). Dadurch können zelltypspezifische Expressionsmuster und auch die Genstilllegung gewährleistet werden. Im Folgenden werden die verschiedenen Histonmodifikationen näher beschrieben, da diese die größte Relevanz für die vorliegende Dissertation besitzen.

1.4.2 Histonmodifikationen

Histonmodifikationen sind, wie zuvor erwähnt, unter anderem für die Veränderung der Chromatinstruktur verantwortlich. Sowohl die zentralen Domänen, als auch die C-Termini der Histone befinden sich nicht gut zugänglich im Inneren des Nukleosoms. Im Gegensatz dazu ragen die Histonschwänze (N-Termini der Histone), die aus 16 bis 44 Aminosäuren bestehen und reich an Lysinen und Argininen sind, nach außen. Histone können somit posttranskriptional an ihren N-Termini modifiziert werden, wobei verschiedene Modifikationen, wie Acetylierung, Methylierung, Phosphorylierung, Ubiquitylierung, SUMOylierung, ADP-Ribosylierung, Biotinylierung und Citrullinierung bisher beschrieben wurden (Luger & Richmond, 1998). Durch die Modifikationen wird die Zugänglichkeit der DNA und somit die Transkription beeinflusst. Die Modifizierung der Histone erfolgt durch verschiedene Enzyme oder auch die sogenannten *Writers* (= „Schreiber“), die die verschiedensten Modifikationen katalysieren. Die Modifikationen sind aber auch dynamisch, reversibel und können durch Enzyme durch die sogenannten *Eraser* (= „Auslöscher“) ebenso wieder entfernt werden (Allis et al, 2007a). Zu den Histon-modifizierenden Enzymen, den „*Writers*“, gehören zum Beispiel Histon-Acetyltransferasen (HAT), die eine Acetylgruppe an ein Lysin (K) im Histon-Schwanz hängen können (Roth et al, 2001). Durch die Acetylierung wird die Ladung der positiven Histone neutralisiert und die Bindung zur negativ geladenen DNA „aufgelockert“ und für die Transkription zugänglich gemacht. Aus diesem Grund wird eine Acetylierung der Histon-schwänze mit einer aktiven Modifizierung in Verbindung gebracht (Zhang et al, 1998). Zu den bekanntesten Histon-Acetylierungen zählen die H3K9Ac, H3K14Ac und H3K27Ac, die vorwiegend in aktiven Promotor- oder *Enhancer*-Bereichen gefunden werden können (Creyghton et al, 2010; Koch et al, 2007). Die Acetyltransferase p300 katalysiert zum Beispiel die Acetylierung der Lysin-Reste H3K14 und H3K19 und PCAF (*P300/CBP-associated factor*) die Lysine H3K9, H3K14 und H3K18 (Kouzarides, 2007). Die Entfernung der Acetylierung erfolgt durch Histondeacetylasen (HDAC). Eine weitere Gruppe sind die Kinasen, die Histone phosphorylieren können. Durch die Phosphatasen (PPTasen) können diese Phosphatgruppen an den Histonschwänzen wieder entfernt werden. Ebenso gehören die Methyltransferasen zu den Histon-modifizierenden Enzymen, die Entweder Arginine (PRMT) oder Lysine (HKMT) methylieren können (siehe Abbildung 1. 8).

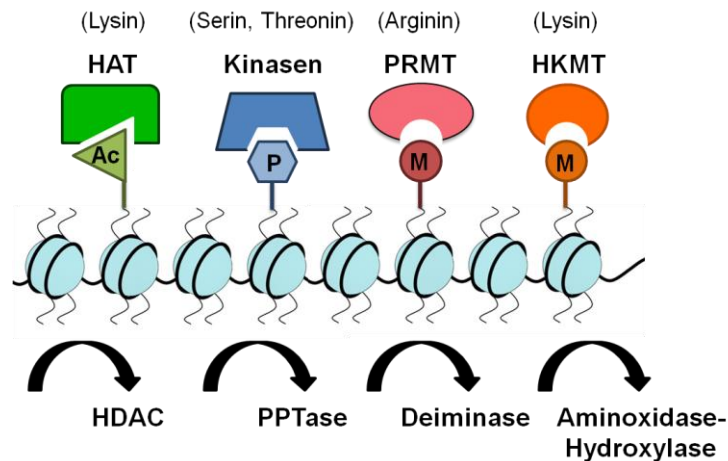


Abbildung 1. 8 Histon-modifizierende Enzyme. Es gibt verschiedene Histon-modifizierende Enzyme unter anderem die „Writer“, die Histonmodifikationen setzen und die „Eraser“, die sie wieder entfernen. Zu der Gruppe der „Writer“ gehören zum Beispiel: die Histonacetyltransferasen (HAT), die Lysine acetylieren können, Kinasen die Serine und Threonine phosphorylieren können, Protein-Arginine-Methyltransferasen (PRMT, die Arginine methylieren und die Gruppe der Histon-Lysin-Methyltransferasen (HKMT), die Lysine methylieren. Durch Histon-Deacetyltransferasen (HDAC), Phosphatasen (PPTase), Deiminasen und Aminoxidase-Hydroxylasen können die jeweiligen äquivalenten Histonmodifikationen wieder entfernt werden, da sie sogenannte „Eraser“ sind. Modifiziert nach Allis et al (2007a).

Histonmodifikationen können in zweierlei Hinsicht Einfluss auf die Genexpression nehmen. Zum Einen verändern sie die elektrostatische Bindung von den basischen Histonen zur negativ geladenen DNA, beeinflussen dadurch die Mobilität der Nukleosomen und auch den Zugang von Transkriptionsfaktoren an die DNA. Zum Anderen können sie auch weitere Chromatin-modifizierende Enzyme rekrutieren, die weitere Modifikationen durchführen (Allis et al, 2007a). Die vielen verschiedenen Kombinationen der Histonmodifikationen und auch die Kombination und Interaktion der unterschiedlichen Modifikationen der Nukleosomen bilden eine komplexe epigenetische Landschaft, die die Genexpression beeinflusst, die auch als „Histon-Code“ beschrieben wird. Das bedeutet, der Histon-Code ergibt sich aus dem Zusammenspiel in „cis“ zwischen Modifikationen an einem Histonschwanz und in „trans“ mit Histonmodifikationen, die an verschiedenen Histonschwänzen innerhalb eines Nukleosoms stattfinden. Im folgenden Kapitel werden Protein-Arginine-Methyltransferasen genauer beschrieben, die Arginine methylieren können.

1.5 Protein-Arginin-Methyltransferasen (PRMT)

Protein-Arginin-Methyltransferasen gehören, wie oben beschrieben, zu den posttranslational-modifizierenden Enzymen, welche die Struktur anderer Proteine durch die kovalente Kopplung einer Methylgruppe verändern. Die von PRMTs katalysierte Argininmethylierung hat

sich in den letzten Jahren zu einem ausgiebigen Gebiet der Forschung entwickelt. Dabei wurden PRMTs als essentielle Bestandteile in diversen Prozessen, wie transkriptionelle Regulation, RNA-Metabolismus oder DNA-Reparatur beschrieben (Bedford & Richard, 2005).

1.5.1 Die Domänenstruktur der Protein-Arginin-Methyltransferasen

Die Enzymfamilie der PRMTs ist von der Hefe bis zum Menschen konserviert, unterscheidet sich jedoch in der Anzahl ihrer Mitglieder in den verschiedenen Organismen. Inzwischen ist bekannt, dass die PRMT-Familie in Säugern 11 Mitglieder umfasst, wobei PRMT10 und PRMT11 keine katalytische Aktivität besitzen und es sich um putative PRMT-Gene handelt (Krause et al, 2007; Wolf, 2009).

Die Aminosäuresequenzlänge variiert unter den verschiedenen PRMTs zwischen 316 und 956 Aminosäuren (siehe Abbildung 1. 9). Außerdem lässt sich die Sequenz der PRMT-Familie in charakteristische Bereiche aufteilen (Zhang et al, 2000). PRMTs bestehen aus der hoch konservierten S-Adenosyl-L-Methionin (SAM)-Bindungsdomäne und der weniger konservierten Substratbindungsdomäne. Außerdem sind, die für die einzelnen PRMTs spezifischen N- und C-terminalen Bereiche, ebenso Bestandteil der PRMTs. Die SAM-Domäne ist für die Bindung des Methylgruppendonors SAM verantwortlich und besteht aus der Rossmann-Falte, mit den verschiedenen Strukturmotiven (Motiv I, post-I, II und III) und der *double-E-loop*-Struktur. Die SAM und die Substratbindungsdomäne bilden die katalytische Domäne der PRMTs. Die Substratbindungsdomäne liegt als eine siebensträngige β -Faltblattstruktur (*barrel-like* Struktur) vor und enthält den für PRMTs charakteristischen *THW-loop* (Katz et al, 2003). Der *THW-loop* mit den konservierten Aminosäuren Threonin (T), Histidin (H) und Tryptophan (T) und der *double E-loop* mit seinen Glutamatresten sind an der Bildung des aktiven Zentrums beteiligt. Die SAM-Bindungsdomäne und die Substratbindungsdomäne bilden die zweiteilige katalytische Domäne. PRMT7 und PRMT10 enthalten zusätzlich eine zweite katalytische Domäne, die vermutlich auf eine Genduplikation zurückzuführen ist (Krause et al, 2007; Miranda et al, 2004). Allgemein kann man die PRMT-Mitglieder anhand ihrer N-terminalen Domänen unterscheiden, deren Länge variabel ist. Außerdem enthalten einige Mitglieder Interaktionsdomänen, wie Zinkfinger- oder die SH3-Domäne. PRMTs sind sowohl cytosolisch, als auch nukleoplasmatisch lokalisiert. Hingegen ist PRMT8 die einzige membranständige PRMT, da es an seinem N-Terminus myristoyliert werden und dann an die Membran binden kann (Lee et al, 2005). PRMT9 und PRMT10 besitzen ein F-Box-Motiv, welches an den Ubiquitin-Ligase-Komplex binden kann (Cardozo & Pagano, 2004). PRMT9 unterscheidet sich am stärksten von seinen PRMT-Mitgliedern auf-

grund seiner fehlenden Substrat-Bindungsdomäne, konnte jedoch aufgrund der konservierten SAM-Bindungsdomäne als PRMT-Mitglied identifiziert werden (Cook et al, 2006).

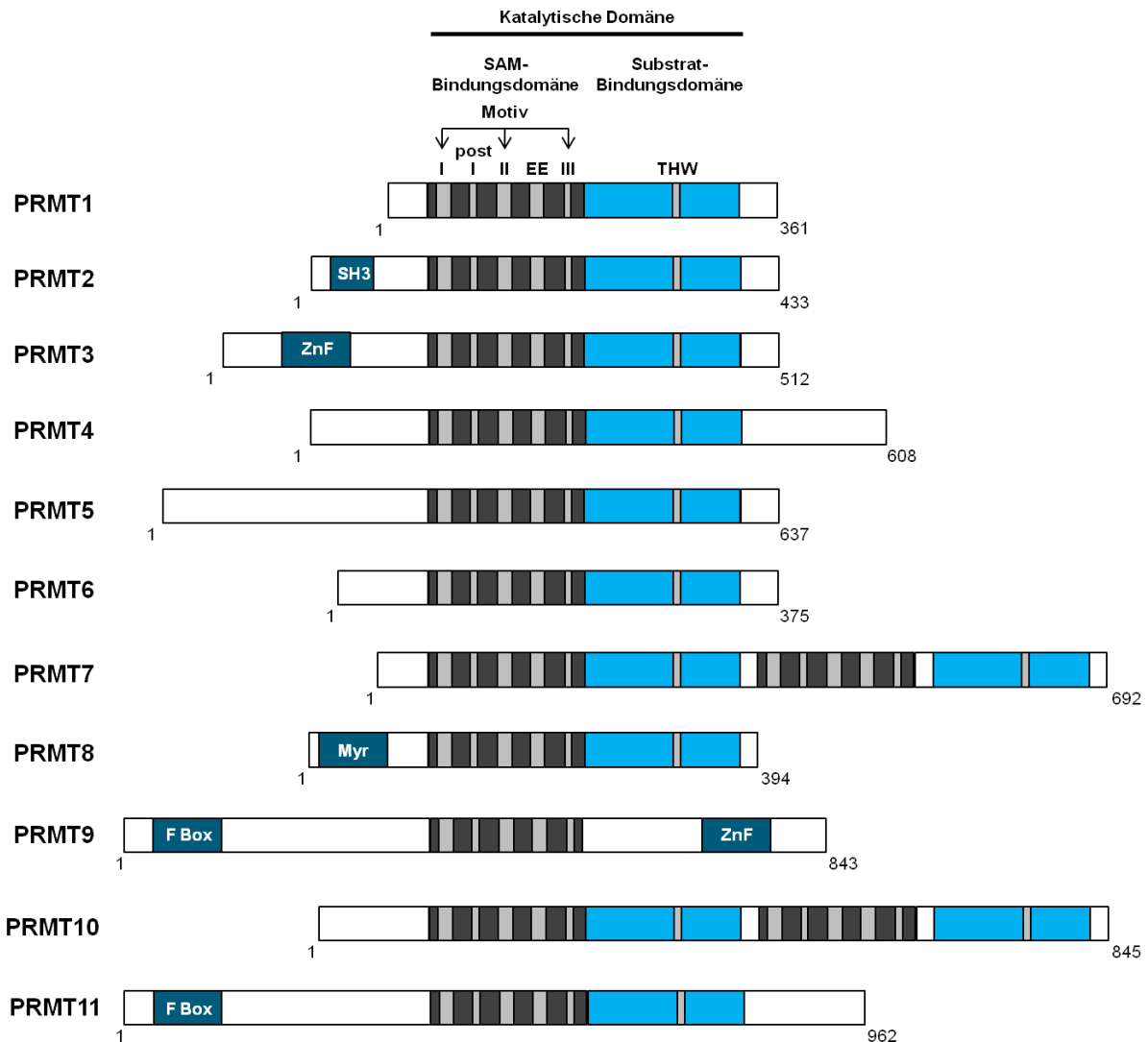


Abbildung 1. 9: Die Proteinfamilie der PRMTs. Die verschiedenen Mitglieder der Protein-Arginin-Methyltransferasen (PRMT1-11) sind dargestellt. Die Zahlen geben die Größe der PRMTs in Aminosäuren an. Die dunkelgrauen Boxen stellen die SAM-Bindungsdomänen dar, während die türkisen Boxen die Substratbindungsdomäne zeigen, die die β -Fass-Domäne enthält. Außerdem sind die Sequenzmotive I, Post I, II, III, sowie der *Double-E-loop* und der *THW-loop* eingezeichnet. Weiterhin sind zusätzliche Domänen der verschiedenen PRMTs gezeigt: SH3 (*Src-homology-3*-Domäne), ZnF (Zinkfinger), F-Box, Myr (Myristoylierungsstelle). Verändert nach Litt et al (2009); Teyssier et al (2010).

Die erste Röntgenstrukturanalyse einer Protein-Arginin-Methyltransferase erfolgte im Jahr 2000 anhand von PRMT3 (Zhang et al, 2000). Im Jahr 2003 konnte die konservierte Region von PRMT1 (AS 41-353) aufgedeckt werden (Zhang & Cheng, 2003). In Abbildung 1. 10 ist die Kristallstruktur von PRMT1 gezeigt. Es sind die konservierten Bereiche, wie die SAM-Bindungsdomäne (grün), sowie die Substratbindungsregion oder auch *barrel-like* Struktur

(gelb) zu erkennen. Der N-Terminus von PRMT1 ist in rot dargestellt. Außerdem ist das Substrat Arginin (dunkelblau) und das gebundene Produkt S-Adenosyl-Homocystein (grau) abgebildet

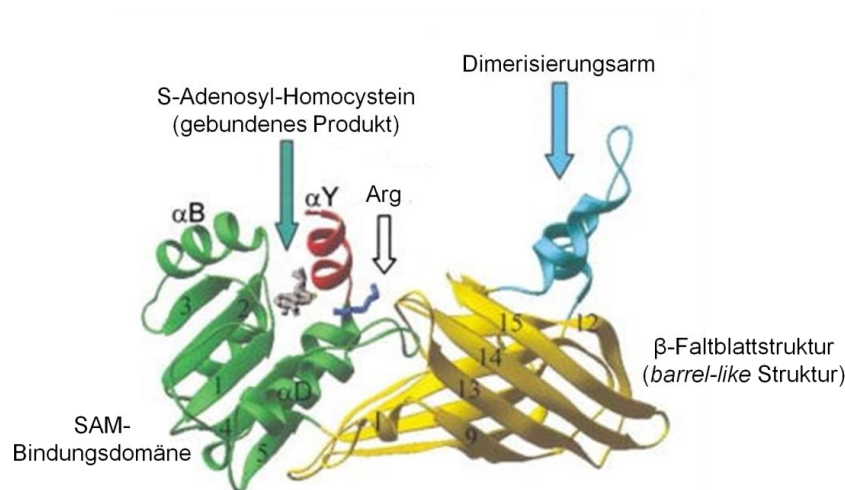


Abbildung 1. 10: Kristallstruktur von PRMT1. Die konservierte SAM-Bindungsdomäne ist in grün, die Substratbindungsdomäne in Gelb, der N-Terminus in rot und der Dimerisierungsarm in hellblau dargestellt. Das gebundene Produkt S-Adenosyl-Homocystein (grau) in der Rossmann-Falte und das nötige Substrat, Arginin (dunkelblau) sind ebenfalls abgebildet. Modifiziert nach (Zhang & Cheng, 2003).

1.5.2 Mechanismus und Funktion der Arginin-Methylierung

Die Methylierung der Stickstoffatome der Guanidinogruppe von Argininen ist eine der häufigsten Methylierungsreaktionen in Säugerzellen (Najbauer et al, 1993; Paik & Kim, 1968). Arginin gehört zu der Gruppe der basischen Aminosäuren und trägt unter physiologischen Bedingungen in seiner Seitenkette eine positive Ladung an der Guanidinogruppe. Dadurch kann es Protein-Protein-Interaktionen durch Wasserstoffbrückenbindungen eingehen (Hughes & Waters, 2006). Die Methylierung der Seitenkette durch eine Protein-Arginin-Methyltransferase führt zu veränderten Bindungseigenschaften dieser Aminosäure in Bezug auf H-Brücken, sterische und hydrophobe Eigenschaften. Die Entdeckung der Methylgruppe am terminalen Stickstoff der Guanidinogruppe erfolgte im Jahr 1967 (Paik & Kim, 1967). Während die Aufreinigung einer Arginin-Methyltransferase und die Aufklärung des Reaktionsmechanismus der PRMTs 1977 erfolgten (Lee et al, 1977). Die Klonierung der entsprechenden cDNA-Sequenz aus Säugergewebe erfolgte etwa 30 Jahre später zeitgleich durch drei Arbeitsgruppen (Abramovich et al, 1997; Henry & Silver, 1996; Lin et al, 1996). Die Guanidino-Gruppe kann auf drei verschiedene Arten methyliert werden, als Monomethylierung

rung (MMA), symmetrische Methylierung (SDMA) und asymmetrische Methylierung (ADMA). Die asymmetrische Dimethylierung tritt dabei am häufigsten auf (Boffa et al, 1977). Bei der Methylierungsreaktion wird eine Methylgruppe vom Kofaktor S-Adenosyl-Methionin (SAM) unter Freisetzung von S-Adenosyl-L-Homocystein (AdoHcy) auf das terminale Stickstoffatom der Guanidinogruppe des Arginins übertragen (siehe Abbildung 1. 11.). Es können neun enzymatisch aktive Familienmitglieder der PRMTs identifiziert werden, die in drei Kategorien basierend auf ihrer Produktspezifität eingeteilt werden. Zum Einen gibt es die Typ I-PRMTs, mit PRMT1, 2, 3, 4, PRMT6 und PRMT8, die Arginin-Monomethylierung und asymmetrische Dimethylierung katalysieren. Zum Anderen gibt es die Typ II-PRMTs, wie PRMT5 und PRMT9, welche eine Arginin-Monomethylierung und eine symmetrische Methylierung vermitteln können. Zuletzt kann noch PRMT7 genannt werden, welche die einzige Typ III- PRMT darstellt, die nur eine Monomethylierung des Arginins katalysiert (Feng et al, 2013; Kaniskan et al, 2015; Zurita-Lopez et al, 2012).

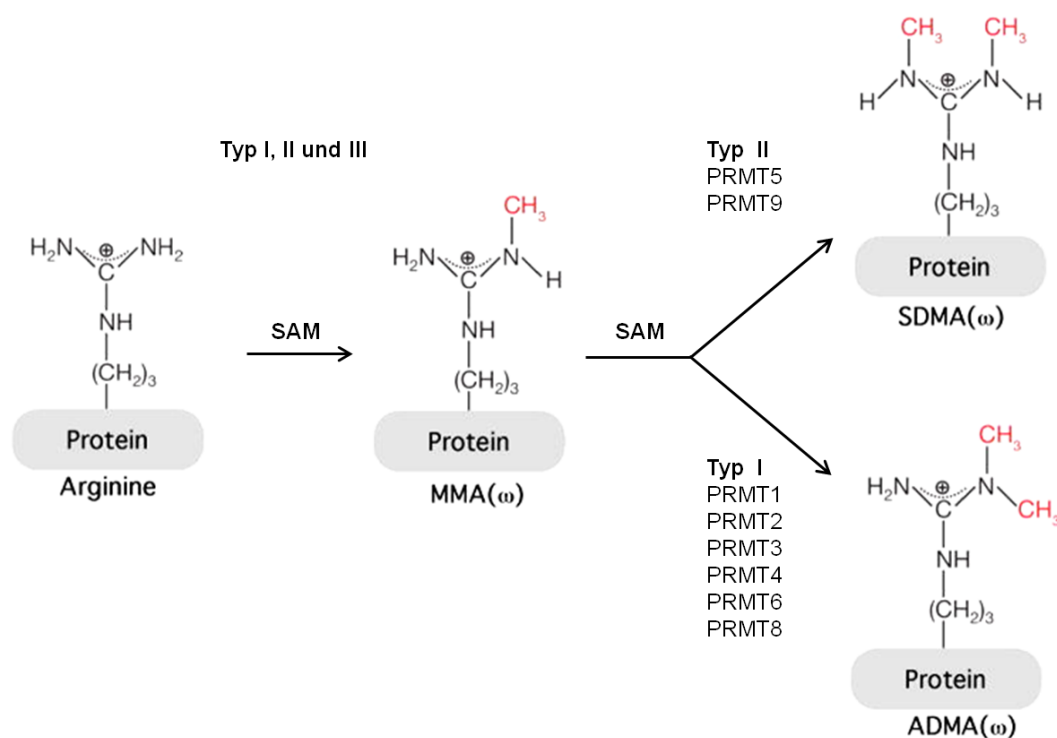


Abbildung 1. 11 Mechanismus der Arginin-Methylierung der PRMTs. PRMTs des Typ I, II und II katalysieren die Bildung von MMA durch den Transfer einer Methylgruppe des Methylgruppendonors S-Adenosyl-Methionin (SAM) auf das ω -Stickstoffatom der Guanidinogruppe des Arginins. PRMT5 und 9 dimethylieren die Arginine symmetrisch, indem eine Methylgruppe auf das zweite terminale Stickstoffatom der Guanidinogruppe übertragen wird. PRMT1, 2, 3, 4, 6 und 8 katalysieren die asymmetrische Dimethylierung des monomethylierten Stickstoffatoms. Modifiziert nach Bedford and Clarke (2009).

1.5.3 Die Protein-Arginin-Methyltransferase 6 (PRMT6)

PRMT6 ist das kleinste Protein seiner Klasse mit 316 Aminosäuren und seine zelluläre Verteilung begrenzt sich hauptsächlich auf den Nukleus. Es besitzt sämtliche konservierte Struktur motive der PRMT-Familie, jedoch außerhalb der katalytischen Domäne keine weiteren speziellen Motive. PRMT6 ist, wie oben erwähnt, eine Typ I-Arginin-Methyltransferase und kann beides, Histone und nicht-Histone methylieren. Zusätzlich wurde in *in vitro*-Methylierungsversuchen festgestellt, dass PRMT6 sowohl die Produktion von monomethyliertem, als auch asymmetrisch dimethyliertem Arginin katalysieren kann (Frankel et al, 2002). Als Substrate dienen dabei Proteine, die GAR-Motive (Glycin- und Arginin reiche Regionen) enthalten. Außerdem konnte für PRMT6 auch eine Automethylierung beobachtet werden, also die Fähigkeit Arginine seiner eigenen Sequenz zu methylieren. Durch die Methylierung seiner Arginine R29, R35 und R37 wird die Protein-Stabilität beeinflusst (Frankel et al, 2002; Singhroy et al, 2013). Ein Nicht-Histon-Substrat von PRMT6 ist das HIV Transaktivatorprotein TAT (Tyrosin- Aminotransferase). Dieses ist reich an Argininen in seiner Transaktivierungsdomäne, in der PRMT6 Arginin 52 und 53 methylieren kann. Dadurch kommt es zu einer Reduktion des Transaktivierungspotentials von TAT und die virale Vermehrung wird verringert (Boulanger et al, 2005). Weiterhin konnten mehrere Studien zeigen, dass PRMT6 HMGA1a (*high mobility group protein A 1 a*) methyliert und dadurch vermutlich die Interaktion dieses Proteins mit der DNA stört (Miranda et al, 2005; Sgarra et al, 2006; Zou et al, 2007). Gleichermaßen methyliert PRMT6 RFX5 (*Regulatory Factor X5*) an dem *AT-hook* Bindemotiv, was die Reprimierung von *HLA-DQA*- Gen (*human leukocyte antigen, DQ alpha 1*) zur Folge hat (Stavride et al, 2013). Kürzlich konnten Han und Kollegen (2014) zeigen, dass die PRMT6-vermittelte Methylierung des Koaktivators CRT2 (*CREB regulated transcription coactivator 2*) die Interaktion mit CREB beeinflusst und für die Expression gluconeogener Gene, wie Phosphoenol-Pyruvat Carboxykinase (PEPCK) notwendig ist (Han et al, 2014). PRMT6 agiert ebenfalls als Ligand-abhängiger und Ligand-unabhängiger Koaktivator von Steroidhormonen (Harrison et al, 2010; Sun et al, 2014). Zum Beispiel methyliert PRMT6 den Estrogen-Rezeptor α (ER α) am Arginin R270 und verstärkt seine Aktivität. Es kann aber auch selbst als Faktor an den ER α binden und mit Hsp90 (*heat shock protein 90*) um die Bindung konkurrieren (Sun et al, 2014). Weiterhin ist bekannt, dass die PRMT6-vermittelte Methylierung der DNA-Polymerase beta (Pol- β), die DNA-Reparatur verstärkt.

Neben der Methylierung von Nicht-Histon-Proteinen erkennt PRMT6 auch Histon-Proteine als Substrate. Generell ist PRMT6 für die Methylierung an dem Arginin 2 am Histon 3 (H3R2me2a) in Säugern bekannt, die reprimierend auf die Transkription wirkt (Guccione et al, 2007; Hyllus et al, 2007; Iberg et al, 2008). Im Kapitel 1.5.5 wird die Auswirkung dieser Modifikationen auf die Transkription nochmals genauer beschrieben. Weiterhin vermittelt

PRMT6 auch die Methylierung der Histonschwänze von Histon H4 (H4R3me2a) und H2A (H2AR3me2a) *in vitro*, die bis jetzt mit aktiv transkribierten Bereichen assoziiert werden (Di Lorenzo & Bedford, 2011). Außer dieser Histonmodifikationen am N-Terminus der Histone, konnten zwei andere Histonmodifikationen beschrieben werden, die *in vivo* durch PRMT6 vermittelt werden. Casadio und Kollegen (2013) konnten zeigen, dass die asymmetrische Methylierung von Arginin 42 in der Kernregion von Histon 3 (H3R42me2a), die durch PRMT6 aber auch durch PRMT4 katalysiert werden kann, einen aktivierenden Effekt auf die Transkription hat. Diese Methylierung in der Kernregion hat vermutlich zur Folge, dass die Histon-DNA-Bindung gestört wird, was die Histone „verschiebbar“ macht und die Transkription verstärkt (Casadio et al, 2013). Die asymmetrische Methylierung von H2AR29 wird ebenfalls von PRMT6 vermittelt und erscheint vermehrt an transkriptionell reprimierten Promotorbereichen und wurde als reprimierende Histonmodifikation beschrieben (Waldmann et al, 2011). Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass PRMT6 das Chromatin epigenetisch in aktivierender, als auch in reprimierender Weise beeinflussen kann.

1.5.4 PRMT6 und seine potentielle Rolle in der Krebsentstehung

PRMT6 ist ebenfalls mit der Progression von Krebs assoziiert. PRMT6 ist in vielen soliden Tumorentitäten überexprimiert, wie zum Beispiel in Brust-, Prostata, Lungenkrebs und in Lymphomen (Yoshimatsu et al, 2011). Da gezeigt werden konnte, dass eine Herunterregulation von PRMT6 in Brustkrebszelllinien in eine zelluläre Seneszenz und eine Inhibition des Tumorwachstums resultiert, hat PRMT6 in Brustkrebs eine onkogene Wirkung. Im Detail konnten zwei Forschergruppen unabhängig voneinander zeigen, dass PRMT6 durch seine Methyltransferase-Aktivität an Histon H3 eine Repression der Tumorsuppressorgenen p21 (Inhibitor der p21 Cyclin-abhängigen Kinase) und p53 verursacht (Neault et al, 2012; Phalke et al, 2012). Sie konnten zeigen, dass nach *Knockout* von PRMT6 die Modifikation H3R2me2a an den spezifischen Promotoren verloren gehen. Wenn PRMT6 vorhanden war, konnte ebenso die Histonmodifikation H3K27me3 an dem Promotor von p21 gefunden werden (Phalke et al, 2012). Außerdem konnte in beiden Promotoren die aktivierende Histonmodifikation H3K4me3, die durch den MLL-Komplex katalysiert wird, nicht gefunden werden (Neault et al, 2012; Phalke et al, 2012). Diese Ergebnisse zeigen, dass PRMT6 bei der Tumorentstehung durch die Reprimierung von p21 und p53 beitragen und dadurch die Transition von einer normalen zu einer Krebszelle fördern könnte. Ob die onkogene Funktion von PRMT6 primär durch seine Rolle in einer gestörten Differenzierung, erhöhte Zellzyklus-Progression oder herabgesetzte Se-

neszenz verursacht wird bleibt noch ungeklärt. Weiterhin ist PRMT6 in der Lage Thrombospondin-1 zu regulieren, welches ein natürlicher Inhibitor der Angiogenese und der Zellmigration darstellt. Dies könnte ebenfalls eine Krebsprogression fördern.

Obwohl durch cDNA *microarrays* beobachtet wurde, dass 40% der Lymphoma-Patienten PRMT6 überexprimieren, wurde bis jetzt noch nicht gezeigt, dass PRMT6 auch in anderen hämatologischen Krankheiten verstärkt exprimiert ist (Yoshimatsu et al, 2011).

1.5.5 Crosstalk zwischen Histonmodifikationen

Wie oben beschrieben können Histonmodifikationen mit einem aktivierenden oder reprimierenden Chromatinstatus assoziiert sein. Die verschiedenen Histonmodifikationen können sich aber auch positiv oder negativ gegenseitig beeinflussen. Dieser *Crosstalk* zwischen den Modifikationen kann auf verschiedenen Weisen stattfinden (Kouzarides, 2007). Es gibt kompetitive Mechanismen zwischen Modifikationen, wenn mehr als eine Modifikation an der gleichen Stelle erfolgen kann. Dies ist besonders für Lysine bekannt, welche acetyliert, methyliert oder ubiquitinyliert werden können. Ein anderer Mechanismus des *Crosstalks* ist, wenn Modifikationen abhängig voneinander sind. Ein gutes Beispiel für diese *trans*-Regulation wurde in *Saccharomyces cerevisiae* entdeckt, wo die Methylierung von H3K4 durch scCOMPASS (*complex proteins associated with Set1*) und H3K79 durch scDot1 (Histone-Lysin-N-Methyltransferase) gänzlich von der Ubiquitinylierung von H2BK123 durch scRad6/Bre1 (*E2 ubiquitin-conjugating enzyme/ E3 ubiquitin ligase*) abhängig ist (Lee et al, 2007). Interessanterweise ist dieser Mechanismus auch in Säugern, einschließlich Menschen konserviert (Kim et al, 2009). Außerdem kann ein Zusammenspiel zwischen verschiedenen Modifikationen, um verschiedene andere Faktoren zu rekrutieren. Zum Beispiel bindet PHF8 (*PHD finger protein 8*) spezifisch an H3K4me3 mit seinem PHD-Finger. Diese Interaktion ist stärker, wenn H3K9 und H3K14 an dem gleichen Histonschwanz acetyliert sind (Vermeulen et al, 2010). Diese Stabilisierung könnte jedoch auch durch zusätzliche Faktoren in dem Komplex mit PHF8, als nur durch einen direkten Effekt von PHF8 bedingt sein.

Weiterhin kann die Bindung eines modifizierenden Enzyms zu einer spezifischen Modifikation durch eine angrenzende Modifikation gestört werden. Dieser *Crosstalk* zwischen Histonmodifikationen kann anhand des Beispiels der von PRMT6-vermittelten Histonmodifikation H3R2me2 und der von dem MLL-Komplex katalysierten H3K4me3 erklärt werden. Durch die Arbeitsgruppe um Jörn Lausen konnte gezeigt werden, dass PRMT6 in undifferenzierten Progenitorzellen durch RUNX1 in einem Komplex mit anderen Korepressoren an Promotoren megakaryozytärer Gene bindet. Die von PRMT6 vermittelte H3R2-Dimethylierung hält die Umwandlung von der Dimethylierung von H3K4 zur Trimethylierung unter Kontrolle und die

Histonmodifikation H3K27me3 ist an den Promotoren der Differenzierungsgene, wie CD41 (megakaryozytäres Gen) vorhanden. Dies hält die Differenzierungsgene in den Progenitorzellen in einem reprimierten Zustand. Während der megakaryozytären Differenzierung ist RUNX1 noch auf dem Promotor detektierbar, die Bindung von PRMT6 und seiner reprimierenden Kofaktoren ist jedoch vermindert. Außerdem wird der reprimierende Komplex durch einen aktivierenden Komplex mit WDR5 und MLL ausgetauscht. Dadurch ist keine Inhibition durch H3R2me2 mehr vorhanden und die Trimethylierung von H3K4 durch den MLL-Komplex kann erfolgen. Dadurch wird ein aktiver Chromatinstatus durchgesetzt und z.B. megakaryozytäre Gene, wie CD41 werden exprimiert (Herglotz et al, 2013) (siehe Abbildung 1. 12).

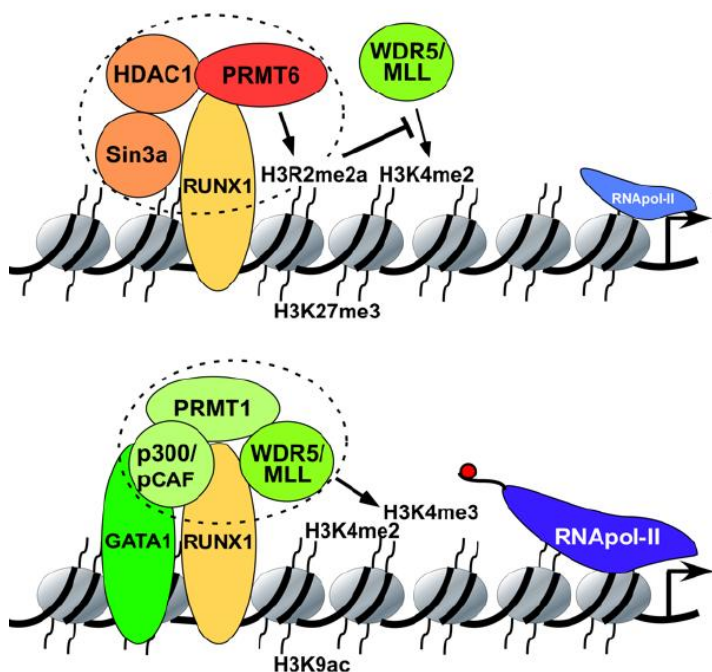


Abbildung 1. 12: Die PRMT6 Aktivität auf RUNX1-Zielgenen. In undifferenzierten Zellen rekrutiert RUNX1 einen Korepressor-Komplex bestehend aus PRMT6, Sin3a und HDAC1. Dieser Komplex entwickelt eine repressive Chromatin-Umgebung mit H3K27me3 und H3R2me2a, die von PRMT6 vermittelt wird. Der Promotor ist in einem intermediären Zustand, da H3K4me2 vorhanden ist, jedoch H3K4me3 inhibiert wird durch die Inhibition der Rekrutierung des WDR5/MLL-Komplexes. Der Korepressor-Komplex wird während der Differenzierung durch einen Koaktivator-Komplex ausgetauscht, der p300, PRMT1, WDR5 und GATA1/FOG1 enthält. Das bedeutet das Fehlen von PRMT6 führt zu einer verminderten Methylierung von H3R2me2a und einer verstärkten Rekrutierung von WDR5. Anschließend können vermehrt aktivierende Histonmodifikationen, wie H3K4me3 und H3K9ac etabliert werden und die RNA-Polymerase kann die Transkription vorantreiben. Modifiziert nach Herglotz et al (2013).

Der Zusammenhang mit dem inhibierenden Effekt der H3R2me2a auf die Trimethylierung von H3K4 konnte zuvor auch schon von anderen Gruppen gezeigt werden. Die von PRMT6 vermittelte H3R2me2a war in vielen Promotoren von Genen mit einem geringen Level an H3K4me assoziiert (Guccione et al, 2007; Hyllus et al, 2007; Iberg et al, 2008; Lee et al, 2012). Es konnte ebenfalls gezeigt werden, dass die antagonistische Beziehung zwischen der Methylierung von H3R2 und H3K4 reziprok ist. Das bedeutet, dass das Vorhandensein der H3K4-Methylierung auf H3 Peptiden, die Fähigkeit von PRMT6, H3R2 zu methylieren, verhindert. Umgekehrt stört ebenso eine Methylierung an H3R2me2a die Erkennung des H3-Schwanzes von WDR5, ein Bestandteil des MLL-Komplexes, welche

für die Überbrückung der MLL-Methyltransferase notwendig ist (Guccione et al, 2007). So kann zusammengefasst werden, dass PRMT6 die Wirkung des MLL-Komplexes antagonisiert und die H3K4-Methylierung in Promotor-Regionen verhindert. Diese Annahme wird dadurch unterstützt, dass eine PRMT6-Überexpression zu einer Inhibierung der Rekrutierung des MLL-Methyltransferase-Komplexes zu H3K4 führt und in eine verminderte Transkription von Hox- (*homeobox genes*) und Myc- abhängigen Genen führt. Dieser Prozess könnte entscheidend für die embryonale Stammzelldifferenzierung und Selbsterneuerung sein, da PRMT6-Protein-Level und H3R2-Methylierungslevel sich mit der Differenzierung von murinen ES-Zellen erhöht. Dies geht dann mit einer verminderten Expression von Genen, die die Pluripotenz und Selbsterneuerung regulieren, einher (Lee et al, 2012).

Bis vor kurzem wurde PRMT6, wie oben beschrieben, nur mit der H3Rme2a in Verbindung gebracht, die die Trimethylierung von H3K4me3 inhibiert. Interessanterweise konnte eine Koinzidenz der Histonmodifikationen H3R2me2 und der H3K27me3 in verschiedenen Promotor-Regionen gefunden werden (Guccione et al, 2006; Herglotz et al, 2013; Kuvardina et al, 2015). Die H3K27me3 wird von PRC2 (*polycomb repressive complex 2*) vermittelt. Stein und Kollegen (2016) konnten zeigen, dass PRMT6 und Untereinheiten von PRC2 und PRC1 an der gleichen regulatorischen Region von HOXA-Genen binden und die differenzierungsabhängige Aktivierung dieser Gene regulieren. Dabei konnte festgestellt werden, dass PRMT6 mit Untereinheiten von PRC1 und PRC2 interagiert. Hingegen resultiert eine Depletion von PRMT6 in einer verringerten Besetzung von PRC1/PRC2 und H3K27me3 an seinen Zielgenen (Stein et al, 2016). Zusammenfassend konnte gezeigt werden, dass PRMT6 dabei hilft, eine weitere reprimierende Histonmodifikation durch das Interagieren mit *Polycomb*-Proteinen zu etablieren. Damit kann der synergistische *Crosstalk* der H3R2me2a und der H3K27me3 erklärt werden.

1.6 Zielsetzung der Arbeit

RUNX1 gehört zu den Schlüsselregulatoren der Hämatopoese und übt seine genregulative Funktion durch Kofaktoren aus. Das bedeutet, dass RUNX1 durch die Rekrutierung von Kofaktoren, wie zum Beispiel epigenetische Modifizierer, einen Einfluss auf die Transkription seiner Zielgene hat. Durch vorherige Arbeiten konnte gezeigt werden, dass die Protein-Arginin-Methyltransferase 6 durch RUNX1 an seine Zielgene rekrutiert wird, da diese kein

eigenes DNA-Bindemotiv besitzt (Herglotz et al, 2013; Kuvardina et al, 2015). Weiterhin ist bekannt, dass eine funktionelle Veränderung von RUNX1 zu Leukämien beitragen kann. Für PRMT6 wurde beschrieben, dass es in vielen verschiedenen Tumorentitäten, wie Brust-, Prostata- und Lungentumoren, sowie Lymphomen überexprimiert ist. Eine Verbindung zur Leukämie konnte bis jetzt jedoch noch nicht eindeutig geklärt werden. Es konnte gezeigt werden, dass eine Herunterregulation von PRMT6 in Brustkrebszellen einen Einfluss auf das Wachstum der Krebszellen und die Seneszenz hat. Aus diesem Grund sollte in der vorliegenden Arbeit zunächst überprüft werden, ob eine Herunterregulation von PRMT6 auch einen Effekt auf Leukämie-Zelllinien hat. Nachfolgend sollte der Frage nachgegangen werden, ob eine mögliche Verbindung zwischen einer vermehrten Expression von PRMT6 und der akuten myeloischen Leukämie besteht. Durch die potentielle Rolle von PRMT6 in der Leukämie-Progression sollte weiterhin geklärt werden, ob PRMT6 ein mögliches Ziel für eine Therapie darstellt. *Small molecules* wurden schon erfolgreich für andere epigenetische Therapien eingesetzt und stellen gute Inhibitoren für Enzyme dar. Dabei sollten im Rahmen dieser Arbeit neue *small molecules* getestet werden, die spezifisch für PRMT6 sind.

Außerdem ist RUNX1 in der Differenzierung von hämatopoetischen Zellen beteiligt. Von Kuvardina und Kollegen (2015) konnte gezeigt werden, dass RUNX1 in der Regulation erythroider Gene beteiligt ist und somit die Differenzierung beeinflusst (Kuvardina et al, 2015). Da RUNX1 und PRMT6 miteinander interagieren, könnte PRMT6 bei dieser Regulation der Differenzierung beteiligt sein. Aus diesem Grund sollte in dieser Arbeit zusätzlich die Rolle von PRMT6 in der normalen Differenzierung, speziell bei der Differenzierung zu Erythrozyten und Megakaryozyten, untersucht werden. Dabei sollte die Expression verschiedener erythroider Differenzierungsmarker, die potentiell von PRMT6 reguliert werden, überprüft werden. Weiterhin wurde spezifisch die Promotorbesetzung des wichtigen erythroiden Markers Glykophorin A während der Differenzierung mittels Chromatin-Immunopräzipitationsversuchen untersucht. Es sollte getestet werden, ob PRMT6 durch seine epigenetische Wirkung die Expression erythroider Gene beeinflusst und sich die Histonmodifikationen an dem GYPA-Promotor verändern. Somit könnte ein Inhibitor, der die enzymatische Aktivität von PRMT6 inhibiert eine Möglichkeit darstellen, die erythroide/megakaryozytäre Differenzierung zu beeinflussen.

Somit war Ziel dieser Arbeit die Rolle von PRMT6 als potentielles Ziel einer Leukämie-Therapie und seine Wirkung in der erythroiden/megakaryozytären Differenzierung zu untersuchen.

2 Material und Methoden

2.1 Materialien

2.1.1 Chemikalien

Agarose	Lonza
Adenosintriphosphat (ATP)	Carl Roth
Ammoniumpersulfat (APS)	Carl Roth
Ampicillin-Natriumsalz (Amp)	Carl Roth
Bacto-Agar	Life Technologies
Benzidin-Dihydrochlorid	Sigma Aldrich
Bromphenolblau	Sigma Aldrich
Bovines Serumalbumin (BSA)	PAA-Laboratories
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Carl Roth
Dithiothreitol (DTT)	Carl Roth
Essigsäure, 100%	Carl Roth
Ethanol, 96%	Carl Roth
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	Carl Roth
Ethylenglycoltetraessigsäure (EGTA)	Carl Roth
Formaldehyd	Carl Roth
Glycerin (Glycerol)	Carl Roth
Glycin	Carl Roth
Glycogen	Carl Roth
Glycylglycin (GlyGly)	AppliChem
2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)ethansulfonsäure (HEPES)	Carl Roth
Isopropanol	Carl Roth
Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid (IPTG)	Carl Roth
Kaliumchlorid (KCl)	Carl Roth
Kaliumdihydrogenphosphat (KH ₂ PO ₄)	Carl Roth
D-Luciferin	Carl Roth
Lachssperma-DNA (SSD)	AppliChem
Lysozym	Carl Roth
Magnesiumsulfat (MgSO ₄)	Carl Roth
Magnesiumchlorid (MgCl ₂)	Carl Roth
β-Mercaptoethanol	Carl Roth
Metafectene	Biontex

Methanol	Carl Roth
Natriumchlorid (NaCl)	Carl Roth
Natriumdeoxycholat	Carl Roth
Natriumdihydrogenphosphat-Dihydrat ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$)	Carl Roth
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Carl Roth
Natriumhydrogencarbonat (NaHCO_3)	Carl Roth
Di-Natriumhydrogenphosphat-Dihydrat ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$)	Carl Roth
<i>o</i> -Nitrophenyl- β -D-galactopyranosid (ONPG)	Carl Roth
Nonidet P40 (NP-40)	AppliChem
Pefabloc SC-Protease-Inhibitor	Carl Roth
Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol (25:24:1)	AppliChem
Protaminsulfat	Sigma Aldrich
Protease-Inhibitor-Mix	AppliChem
Proteinase K	AppliChem
Polyethylenimin (PEI)	Polysciences
RNAse A (aus PureLink HiPure Plasmid Midiprep Kit)	Invitrogen
Roti®-Block	Carl Roth
Rotiphorese Gel 30	Carl Roth
D(+)-Saccharose	Carl Roth
Salzsäure (HCl)	Carl Roth
Tetramethylethylenediamine (TEMED)	Carl Roth
Tris(hydroxymethyl)-aminomethan (Tris)	Carl Roth
Triton X-100	Carl Roth
Trypanblau	Sigma Aldrich
Tween-20	Carl Roth
Wasserstoffperoxid (H_2O_2)	Sigma Aldrich

2.1.2 Medien, Zusätze und Zytokine für die Zellkultur

DMEM-Medium	Gibco/Invitrogen
(h) Erythropoetin (EPO)	AppliChem
Estradiol	Sigma Aldrich
Fötales Kälberserum (FKS)	PAA-Laboratories
(h) Flt-3 Ligand	PeproTech
(h) Interleukin-3 (IL-3)	PeproTech
(h) Interleukin-6 (IL-6)	PeproTech

(h) Interleukin- 9 (IL-9)	PeproTech
L-Glutamin	PAA-Laboratories
MethoCult H4435 enriched Methylcellulose-Medium	StemCell Technologies
MethoCult™ GF M3434 enriched Methylcellulose-Medium	StemCell Technologies
Penicillin/Streptomycin (Pen/Strep)	PAA-Laboratories
Phosphatgepufferte Salzlösung (PBS)	PAA-Laboratories
RPMI-Medium	Gibco/Invitrogen
(h) Stammzellfaktor (SCF)	PeproTech
StemSpan SFEM-Expansionsmedium	StemCell Technologies
12-o-Tetradecanoylphorbol-13-Acetat (TPA)	Sigma Aldrich
(h) Thrombopoetin (TPO)	PeproTech
Trypsin-EDTA (0,05%)	Gibco/Invitrogen

2.1.3 Bakterienstämme und Medien

DH5α	<i>Escherichia coli</i> Stamm zur Amplifikation von Plasmid-DNA
One Shot TOP10	<i>Escherichia coli</i> Stamm zur Amplifikation von Plasmid-DNA
LB-Medium	1 % (w/v) Baktotrypton 0,5 % (w/v) Hefeextrakt 177 mM NaCl, pH 7,0
LB-Agar	1,5 % (w/v) Agar in LB-Medium Glukoselösung 20 % (w/v)
Ampicillin	Endkonzentration 50 µg/ml
Kanamycin	Endkonzentration 25 µg/ml

2.1.4 Verwendete Kits

CD34 MicroBead Kit	Miltenyi Biotec
ChIP DNA Clean & Concentrator	Zymo Research
Cell Proliferation Kit II (XTT)	Roche Diagnostics
GeneJet Gel Extraction Kit	Thermo Fisher Scientific
GeneJet PCR Purification	Thermo Fisher Scientific
GeneJet Plasmid Miniprep Kit	Thermo Fisher Scientific
Lineage Cell depletion Kit, mouse	Miltenyi Biotec
Omniscript Reverse Transcription Kit	Qiagen

PureLink HiPure Plasmid Midiprep Kit	Invitrogen
RNeasy Mini Kit	Qiagen
Roti-Lumin Kit	Carl Roth
Roti-Transform Kit	Carl Roth
Roti-Quant	Carl Roth

2.1.5 Verwendete Geräte

Tabelle 2. 1: Übersicht aller verwendeter Geräte.

Gerät	Bezeichnung	Hersteller	Ort
Autoklav	HST 4-5-6 E	Zirbus Technology	Bad Grund
Bakterienbrutschrank	Kelvitron	Heraeus Holding GmbH	Hanau
DNA Thermal Cycler	Thermal Cycler 480	Perkin Elmer Cetus	Tuttlingen
DNA Thermal Cycler	GeneAmp 2400	Perkin Elmer Cetus	Tuttlingen
Elektrophoresekammer DNA	PerfectBlue Gelsystem Mini S	PeqLab Biotechnologie GmbH	Erlangen
Elektrophoresekammer Protein	Elektrophoresesystem	PeqLab Biotechnologie GmbH	Erlangen
Entwicklermaschine	OptimaxTQ	MS Laborgeräte	Diehlheim
FACS-Analyse-Gerät	BD FACS Aria Cell Sorter	BD Biosciences	Franklin Lakes
FACS-Analyse-Gerät	BD FACS Canto II	BD Biosciences	Franklin Lakes
FACS-Analyse-Gerät	BD FACS Fortessa LSRII	BD Biosciences	Franklin Lakes
Falkon-Zentrifuge	Universal 320R	Andreas Hettich GmbH & Co KG	Tuttlingen
Gefrierschrank -80°C	Hettich Freezer	Andreas Hettich GmbH & Co KG	Tuttlingen
Geldokumentation DNA	Gel Doc 2000	Bio-Rad Laboratories	München
Gelgießstand	Gießschiene PerfectBlue Mini S	PeqLab Biotechnologie GmbH	Erlangen

Heizbad	1002	GFL Gesellschaft für Labortechnik GmbH	Burgwedel
Kühlzentrifuge	CT15RE	Hitachi High-Technologies Europe GmbH	Mannheim
Light Cycler	LightCycler480	Roche	Mannheim
Real time PCR Cycler	StepOne Plus Real time	Applied Biosystems	Foster City
Luminometer	Microlumat LB96P	Berthold Technologies GmbH	Bad Wildbad
Magnetrührer	Ikamag RCT	Ika	Staufen
Mikroskop-Zellkultur	Diavert	Leitz	Wetzlar
NanoDrop	New Drop 1000 Spectrophotometer	Peqlab Biotechnologie GmbH	Erlangen
Odyssey-Entwickler	Odyssey CLX imaging System	LI-COR Bioscience	Bad Homburg
PCR-Thermocycler	Primus 96	PeqLab Biotechnologie GmbH	Erlangen
Photometer	BioPhotometer	Eppendorf	Hamburg
Rollmixer	R137	PSI Medizintechnik	Laudenbach
Schüttelinkubator	TH15	Edmund Bühler GmbH	Hechingen
Schüttler	Skyline DRS-12 ELMI LTF	Labortechnik GmbH	Wasserburg
SemiDry-Blotter	PerfectBlue Semi-Dry Elektro Blotter Web S	PeqLab Biotechnologie GmbH	Erlangen
Sonifizierer	Bioruptor	Diagenode	Liège
Spektrometer	SpektraMax 340	MWG Biotech AG	Ebersberg
Sterilbank	CleanAir	BioFlow Technik	Meckenheim
Stromgeber	Consort	Labortechnik Fröbel	Wasserburg
Vortexer	Vibrofix VF1	Janke & Kunkel Labor-technik	Staufen i. Br.

Tank-Blotter	PerfectBlue Tank Elektro Blotter Web S	PeqLab Biotechnologie GmbH	Erlangen
Thermoblock	TDB-120	Kisker-Biotech	Steinfurt
Waage	EMB 600-2	Kern & Sohn GmbH	Balingen
Wasserbad	Polystat CC3	P.Huber Kältemaschinenbau GmbH	Offenburg
Zählkammer	Glasstic Glide	Hycor Biomedical Inc	Kassel
Zellkulturbrutschrank	Cellstar	Nunc	Wiesbaden-Biebrich
Zellkulturzentrifuge	Megafuge 1.0R	Heraeus Holding GmbH	Hanau
Zentrifuge	Biofuge pico	Heraeus Holding GmbH	Hanau

2.2 Proteinbiochemische Methoden

2.2.1 Antikörper

Tabelle 2. 2 Übersicht der verwendeten Primärantikörper.

Name	Organismus	Verwendung	Hersteller
Anti-GATA1	Ziege	3 µg/IP	Santa Cruz (sc-9361)
Anti-H3	Kaninchen	3 µg/ChIP, 1:1000 im WB	Abcam (ab1791)
Anti-H3K4me3	Maus	3 µg/ChIP, 1:500 im WB	Abcam (ab1012)
Anti-H3K27me3	Maus	3 µg/ChIP, 1:500 im WB	Abcam (ab6002)
Anti-H3R2me2a	Kaninchen	3µg/ChIP, 1:500 im WB	Abcam (ab80075)
Anti-H4R3me2a	Kaninchen	1:500 im WB	Active motif (39705)
Anti-Lamin A/C	Maus	1:1000 im WB	BD Bioscience (612163)
Anti-Lamin B1	Kaninchen	1:1000 im WB	Abcam (ab16048)
Anti-PADI4	Kaninchen	4 µg/ChIP	Abcam (ab38772)

Anti-PRMT6 H2	Maus	1:250 im WB	Santa Cruz (sc-365018)
Anti-PRMT6		8 µL/ChIP	Millipore (ABE124)
Anti-RNA-Pol II	Maus	3 µg/ChIP	Abcam (ab5408)
Anti-RUNX1	Maus	1:250 im WB	Santa Cruz (sc365644)
Anti-RUNX1	Kaninchen	5 µg/ChIP	Abcam (ab23980)
Anti-TAL1	Kaninchen	5 µg/ChIP	Abcam (ab75739)
Anti-WDR5	Maus	5 µg/ChIP	Santa Cruz (sc100895)

WB = Western Blot, ChIP = Chromatin-Immunopräzipitation

Tabelle 2. 3 Übersicht aller für Western Blot verwendeter Sekundärantikörper.

Name	Organismus	Verwendung	Hersteller
Anti-Maus IgG-HRP	Ziege	1:5000 im WB	Santa Cruz (sc2005)
Anti-Kaninchen IgG-HRP	Ziege	1:5000 im WB	Santa Cruz (sc-2004)
Anti-Ziege IgG-HRP	Esel	1:5000 im WB	Santa Cruz (sc-2020)
Anti-Kaninchen IRDye 800CW	Esel	1:15000 im WB	Li-Cor (926-32213)
Anti-Ziege IRDye 800CW	Esel	1:15000 im WB	Li-Cor (925-32214)

WB = Western Blot, HRP = *horse radish peroxidase*

Tabelle 2. 4 Übersicht aller für ChIP verwendeter Immunoglobuline.

Name	Verwendung	Hersteller
Maus IgG	3-10 µg/ChIP	Santa Cruz (sc-2025); 200 µg/0,5 ml
Kaninchen IgG	3-10 µg/ChIP	Santa Cruz (sc-2027); 200 µg/0,5 ml
Ziege IgG	3-10 µg/ChIP	Santa Cruz (sc-2028); 200 µg/0,5 ml

ChIP = Chromatin-Immunopräzipitation

2.2.2 Herstellung von Zellextrakten

Für die Herstellung von Gesamtzellextrakten wurden die geernteten Zellen zunächst mit kaltem PBS gewaschen, 5 Minuten bei 1500 rpm abzentrifugiert und das entstandene Pellet, je nach Größe in RIPA-Puffer gelöst. Zu dem RIPA-Puffer wird Protease-Inhibitor (100x) hinzugefügt. Darauf folgend wurde pro 100 µl, 1 µl einer 20%igen Nonident-P40 (NP40)-Lösung hinzugegeben und kurz gevortext. Danach folgte eine Inkubation von etwa 15 Minuten auf dem Drehrad bei 4°C. Nach der Inkubation wurden die Proben bei 150000 rpm für 15 Minuten zentrifugiert, um die entstandenen Zelltrümmer von dem Lysat zu trennen. Der Proteinüberstand wurde aliquotiert, mit flüssigem Stickstoff schock gefriert und bei -80°C gelagert oder sofort verwendet.

RIPA-Puffer:

50 mM TrisHCl (pH 8); 150 mM NaCl; 2 mM EDTA (pH 8); 1% NP-40; 0,5% Sodium Deoxycholate; 1x Protease-Inhibitor (frisch)

Phosphatgepufferte Kochsalzlösung (PBS):

137 mM NaCl; 2,7 mM KCl; 10 mM Na₂HPO₄; 1,7 mM KH₂PO₄

Die Herstellung von Kernextrakten basiert auf dem Protokoll von Schreiber und Kollegen (Schreiber et al, 1989). Die nachfolgenden Arbeitsschritte wurden alle auf Eis durchgeführt. Nach dem Waschen und Abzentrifugieren bei 1500 rpm und 4°C der geernteten Zellen mit kaltem PBS, wird das Zellpellet in Puffer A gelöst. Es wurden etwa vier Volumenanteile des Pellets an Puffer A zugeben. Nach 5-minütiger Inkubation erfolgte die Zugabe von 2 µl der NP-40-Lösung (20%). Danach wurden die Proben direkt für 5 min bei 150000 rpm zentrifugiert. Durch den Zentrifugationsschritt erschienen die Zellkerne als Pellet, während sich im Überstand die Zytoplasmafraktion befand. Das entstandene Pellet wurde nun in etwa der zweifachen Menge des Volumens in Puffer C resuspendiert und anschließend für 30 min auf Eis inkubiert. Danach folgte ein 30-minütiger Zentrifugationsschritt bei 150000 rpm und 4°C, bei dem die Kernproteine von den unlöslichen Bestandteilen getrennt und die Kernfraktion gewonnen wurden. Beide Fraktionen wurden mit flüssigem Stickstoff schock gefroren und bei -80°C gelagert oder direkt verwendet.

Puffer A:

10 mM Tris (pH 7,5); 0,1 mM EDTA (pH 8,0); 0,1 mM EGTA (pH 8,0); 10 mM KCl; 1 mM DTT; Protease-Inhibitor-Cocktail

Puffer C:

20 mM Tris (pH 7,5); 1 mM EDTA (pH 8,0); 1 mM EGTA (pH 8,0); 0,4 M NaCl; 20 % (v/v) Glycerol; 1 mM DTT; Protease-Inhibitor-Cocktail; 20% NP-40 Lösung: in H₂O

2.2.3 XTT-Assay

Der XTT-Assay erlaubt die Messung der Zellproliferation oder auch Zellviabilität. Das Tetrazolium-Salz XTT (2,3-Bis-(2-Methoxy-4-Nitro-5-Sulfophenyl)-2H-Tetrazolium-5-Carboxanilide) ist besonders nützlich, um eine Messung und Quantifizierung lebender Zellen durchzuführen. Der Assay basiert auf einer Spaltung des gelben Tetrazolium-Salzes zu einem orangenen Formazan-Farbstoff, die in metabolisch aktiven Zellen stattfindet. Das bedeutet, diese Umwandlung erfolgt nur in lebenden Zellen. Der Formazan-Farbstoff, der gebildet wird, ist löslich in wässrigen Lösungen und kann direkt mit einem Spektrometer gemessen werden. Der nicht radioaktive, kolorimetrische Assay mit XTT wurde von Scudiero et al. 1988 entwickelt und weiterhin verbessert (Paull et al, 1988; Roehm et al, 1991; Scudiero et al, 1988; Weislow et al, 1989). Der Assay wurde verwendet, um eine spektrometrische Quantifizierung des Zellwachstums und der Viabilität, sowie Effekte von Zusätzen zu messen. In dieser Arbeit wurde der Assay genutzt, um die IC_{50} -Konzentration bezogen auf das Zellwachstum verschiedener Inhibitoren zu messen. Dafür wurden K562-Zellen in einer 96-*well*-Platte 5×10^4 Zellen/*well* in 100 μ l Kulturmedium ausgesät und anschließend für 1 Stunde im Brutschrank ruhen gelassen. Danach wurden die verschiedenen Inhibitoren in verschiedenen Konzentrationen zu den Zellen dazu gegeben und die Zellen für zwei Tage inkubiert. Nun erfolgte die Proliferationsmessung mittels XTT-Farbstoff, die nach Herstellerangaben von Roche Diagnostics durchgeführt wurde. Das XTT *labeling* Reagenz und das *electron coupling* Reagenz (ECR) wurden auf Eis aufgetaut und 50 μ l der XTT-*labeling*-Lösung mit 1 μ l des ECR vermischt. Von dieser Mischung werden 50 μ l pro *well* hinzupipettiert und die Zellen wieder in den Inkubator bei 37°C gestellt. Die Absorption wurde nach einer und nach zwei Stunden mit einem Spektrometer bei 450 nm gemessen mit einer Referenzwellenlänge von 650 nm.

2.2.4 Western Blot

Der Western Blot bezeichnet die Übertragung von Proteinen auf eine Trägermembran, die dann nachfolgend durch eine Antikörper-Reaktion identifiziert werden können. Somit werden Proteine innerhalb eines Proteingemisches identifiziert. Zunächst werden dafür, die aus den Zellen gewonnenen Protein-Lysate, in 4-fachem Protein-Ladepuffer aufgenommen und fünf Minuten bei 95°C erhitzt. Nachfolgend können die Proteine mit Hilfe einer Polyacrylamid-Gelelektrophorese aufgetrennt werden. Die Gelelektrophorese beruht auf einem SDS-Tris-Glycin-Puffersystem (SDS-PAGE) und trennt die Proteine nach ihrem Molekulargewicht auf. Die Auftrennung erfolgte zunächst etwa 30 min bei 80 V bis die Proben im Trenngel angekommen sind und anschließend bei 120 V. Darauf folgte ein Transfer der Proteine mittels se-

mi-dry Western Blot in einem Towbin-Puffer-System auf eine PVDF- oder eine Nitrocellulose-Membran für etwa 90 min bei 65 mA/ Membran. Als Proteinmarker diente „PageRuler Prestained Protein Ladder“ von Thermo Fisher Scientific.

Blockiert wurden die Membranen nach dem Transfer entweder mit einer 2,5 %igen Magermilchlösung in TBS/T oder in 1x Roti-Block (Carl Roth) in PBS/T für eine Stunde bei Raumtemperatur. Anschließend folgte eine Inkubation der Membranen mit dem Primärantikörper (Tabelle 2. 2) über Nacht bei 4°C oder für die Histon-Antikörper für 1 Stunde bei Raumtemperatur. Nach dreimaligem Waschen der Membran mit PBS/T für jeweils 10 Minuten, folgte eine Inkubation mit dem Sekundärantikörper (Tabelle 2. 3) für eine Stunde bei Raumtemperatur. Nach drei weiteren Waschschritten mit PBS/T wurde die Detektion der Proteine mittels einer ECL-Lösung (Roti-Lumin Kit, Carl Roth) durchgeführt. Durch die HRP-gekoppelten Sekundärantikörper kann eine Chemolumineszenz sichtbar gemacht werden, da HRP die Umsetzung von Luminol in seine oxidierte Form katalysiert. Diese konnte im Geldokumentationssystem detektiert werden. Wenn die Sekundärantikörper für das Odyssey-System benutzt wurden, erfolgte die Detektion mit dem Odyssey-System CLX von LI-COR, da die Sekundärantikörper in diesem Fall Fluoreszenz-gekoppelt waren.

(4x) Proteinladepuffer:

500 mM Tris/HCl (pH 6,8); 4% (w/v) SDS; 30% (v/v) Glycerol; 40 mM DTT; 5% (v/v), β -Mercaptoethanol; etwas Bromphenolblau

SDS-Laufpuffer:

25 mM Tris; 192 mM Glycin; 0,1% (w/v) SDS

Towbin-Puffer:

25 mM Tris; 192 mM Glycin; 20% (v/v) Methanol, pH 8,3

Magermilchlösung:

5% (w/v) Magermilchpulver in TBS; 0,1% (v/v) Tween-20

PBS:

137 mM NaCl; 2,7 mM KCl; 10 mM Na_2HPO_4 ; 1,7 mM KH_2PO_4

TBS:

50 mM Tris-Cl; pH 7,6; 150 mM NaCl

PBS/T:

1x PBS; 0,1% (v/v) Tween-20

TBS/T:

1x TBS; 0,1% (v/v) Tween-20

2.2.5 Luciferase-Reportergen-Assay

Der Luciferase-Reportergen-Assay wird für die Untersuchung der Regulation von Promotoren benutzt. Dieser Assay beruht auf der Verwendung eines Reportergens in einem Plasmidvektor, welches in diesem Fall die Luciferase darstellt. Der zu untersuchende Promotor wird in dem Vektor dann vor dem Luciferase-Gen kloniert, sodass dieses Gen unter der Kontrolle des Promotors steht. Dabei ist die Luciferase-Expression proportional zur Aktivität des zu untersuchenden Promotors. Weiterhin kann durch eine Kointransfektion mit weiteren Plasmiden, die für bestimmte Transkriptionsfaktoren codieren, die Effekte dieser Faktoren untersucht werden. Die Transfektion erfolgte hierbei mittels Lipofektion in die Zellen, die dann nach 48 Stunden lysiert und die Luciferase-Aktivität nach Zugabe des Substrats gemessen werden kann. Die Luciferase katalysiert die Oxidation von Luziferin zu Oxyluziferin. Die freigesetzte Chemilumineszenz wurde dann bei einer Wellenlänge von 560 nm mit einem Luminometer Microlumat LB96P (Berthold EG&G) gemessen. Zusätzlich wurde ein Basalwert für den Lyse-Puffer ermittelt.

Dieser Assay wurde in HEK293T- und in K562-Zellen durchgeführt. Für die HEK293T wurden 9×10^4 Zellen in einer 24-*well*-Platte mit DMEM ausgesät. Am darauffolgenden Tag wurden die Zellen transfiziert und 48 Stunden später mit 1x PBS gewaschen und die Zellen mit 90 µl Lyse-Puffer lysiert. Nach einer 30-minütigen Inkubation auf Eis wurde das Lysat 10 Minuten bei 1500 rpm zentrifugiert und 5 µl in einer 96-*well*-Platte von Lumitrac 200 gemessen. Mit der Suspensionszelllinie K562 wurde ähnlich verfahren wie mit den HEK293T-Zellen. Jedoch wurden $2,5 \times 10^5$ Zellen in 500 µl RPMI in einer 24-*well*-Platte ausgesät und die Zellen konnten schon 4 Stunden nach dem Aussäen transfiziert werden. Außerdem wurde für die Messung der Luciferase-Aktivität 15 µl des Lysats verwendet.

Lyse-Puffer:

50 mM Tris (pH 7,4); 1% (v/v) Triton X-100; 50 mM NaCl

Luciferase-Puffer:

21,625 mM Glycylglycine (Gly Gly); 1 mM Adenosintriphosphat (ATP); 10 mM MgSO₄; 0,075 mM Luciferin

Phosphatgepufferte Kochsalzlösung (PBS):

137 mM NaCl; 2,7 mM KCl; 10 mM Na₂HPO₄; 1,7 mM KH₂PO₄

Zur Normalisierung der Transfektionseffizienz wurde zeitgleich ein β -Galactosidase-Assay durchgeführt. Dafür wurde ein β -Galactosidase-Vektor in gleicher Menge für jedes *well* kointransfiziert, welcher das LacZ-Gen enthält, welches für die β -Galactosidase codiert. Die Aktivität der β -Galactosidase ist dabei proportional zu der Transfektionseffizienz. Die Messung erfolgte für K562 mit 15 µl und für HEK293T-Zellen mit 5 µl des Zelllysats in einer 96-*well*-Platte (Mikrotestplatte 96-*well* F, Sarstedt). Nach Zugabe von 100 µl der

β -Galactosidase-Lösung kann eine Gelbfärbung in einem Spektrometer (SPECTRAmax 340, Molecular Devices) bei 420 nm gemessen werden. Die Gelbfärbung resultiert aus der Hydrolyse des *o*-Nitrophenyl- β -D-galactopyranosid (ONPG) zu Galactose und *ortho*-Nitrophenol (gelb), die durch β -Galactosidase katalysiert wird.

β -Galactosidase-Lösung:

11,1 mM MgCl_2 ; 50 mM β -Mercaptoethanol; 3,25 mM ONPG; 74,4 mM Natrium-Phosphat (pH 7,5)

Natrium-Phosphat-Lösung (0,1 M):

82 mM $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$; 18 mM $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$

o-Nitrophenyl- β -D-galactopyranosid (ONPG):

13,28 mM in 0,1 M Natrium-Phosphat-Lösung

2.2.6 Chromatin-Immunopräzipitation (ChIP)

Mit der Chromatin-Immunopräzipitation konnte eine Transkriptionsfaktor-Bindung oder eine Histonmodifikation in einer Promotorregion nachgewiesen werden. Die Methode wurde nach dem X-ChIP-Protokoll von Abcam durchgeführt. Dafür wurden 1×10^7 K562- oder CD34+-Zellen geerntet, mit 1x PBS gewaschen und in 10 ml Medium resuspendiert. Der *Crosslink* von DNA und Proteinen erfolgte für 10-15 Minuten bei Raumtemperatur mit Formaldehyd mit einer Endkonzentration von 0,75%. Durch die Zugabe von Glycin mit einer Endkonzentration von 125 mM für 5 Minuten wurde der *Crosslink* neutralisiert. Nachfolgend wurden die Zellen dreimal mit kaltem PBS gewaschen und schlussendlich in 1 ml ChIP-Lysepuffer gelöst und 30 Minuten auf Eis inkubiert. Nun kann das Chromatin mit Hilfe eines Sonifizierungsgeräts Bioruptor UCD-200 (Diagenode) auf eine Fragmentgröße von 300-1000 bp zerkleinert werden. Durch eine Zentrifugation bei 15000 rpm und 4°C für 10 min wurden die Zelltrümmer pelletiert und anschließend der Überstand aliquotiert und schock gefroren oder direkt verwendet. Für die Immunopräzipitation müssen die Protein-G-Beads (Life Technologies) vor dem Einsatz blockiert werden. Dies geschah durch die Zugabe von Lachssperma-DNA (75 ng/1 μl beads) in RIPA-Puffer ohne SDS für 30 Minuten. Der nächste Blockierungsschritt erfolgt mit der Zugabe von 1 x Roti-Block für 30 Minuten in RIPA-Puffer. Nach zwei Waschschritten mit dem Puffer können die beads verwendet werden. Für die Immunopräzipitationsreaktion wurden etwa 50-100 μl Chromatin eingesetzt, die mit 5 μl blockierten magnetischen Protein-G-beads und 3-10 μg Antikörper (Tabelle 2. 2) oder IgG (Tabelle 2. 4) versetzt und mit RIPA-Puffer ad 400 μl aufgefüllt wurden. Diese Mischung wurde über Nacht bei 4°C auf einem Drehrad-Rotator inkubiert. Für die Input-Kontrolle wurde die gleiche Menge an Chromatin bei 4°C bis zur nächsten Verwendung gelagert.

Am darauffolgenden Tag werden die beads zunächst dreimal mit dem Waschpuffer I für jeweils 10 Minuten und anschließend dreimal mit dem Waschpuffer II für jeweils 10 Minuten auf dem Rotator bei 4°C gewaschen. Bei dem Wechsel des Waschpuffers wurde ebenfalls das Eppendorfgefäß gewechselt. Die Elution der DNA von den beads erfolgte mit 120 µl Elutionspuffer für 30 Minuten bei 30°C bei 1000 rpm auf dem Schüttelinkubator. Dann wird der Überstand überführt und das Eluat mit 5 µl Proteinase K (20 mg/ml) versetzt und bei 700 rpm bei 65°C für 4-5 Stunden inkubiert, um den *Crosslink* aufzuheben. Bei diesem Schritt wurde die Input-Probe wieder mitgeführt. Nun erfolgt die Aufreinigung der DNA mit dem ChIP DNA Clean & Concentrator Kit von Zymo Research nach Herstellerangaben. Zuletzt werden die Proben in 40 µl mit dem Elutionspuffer eluiert. Die DNA kann dann bei 4°C für etwa eine Woche bis zur Verwendung gelagert werden.

ChIP-Lysepuffer:

50 mM HEPES-KOH pH 7,5; 140 mM NaCl; 1 mM EDTA pH8; 1% Triton X-100; 0,1% Sodium Deoxycholate; 0,4% SDS; Protease-Inhibitor (immer frisch hinzufügen)

RIPA-Puffer:

50 mM Tris-HCl pH 8; 150 mM NaCl; 2 mM EDTA pH 8; 1% NP-40; 0,5% Sodium Deoxycholate (und einen Puffer ohne 0,1% SDS); Protease-Inhibitor (immer frisch hinzufügen)

Waschpuffer I:

0,1% SDS; 1% Triton X-100; 2 mM EDTA pH 8; 150 mM NaCl; 20 mM Tris-HCl pH 8

Waschpuffer II:

0,1% SDS; 1% Triton X-100; 2 mM EDTA pH 8; 500 mM NaCl; 20 mM Tris-HCl pH 8

Elutionspuffer:

1% SDS; 100 mM NaHCO₃

Die DNA wurde mittels quantitativer *real-time*-PCR analysiert. Dafür wurden 1 µl der DNA pro Ansatz verwendet und Triplikate erstellt (siehe Tabelle 2. 5). Die für die PCR-Reaktion verwendeten Primer werden in Tabelle 2.6 dargestellt. Die PCR wurde mit dem SYBR Green Mix im LightCycler 480 (Roche) oder mit dem StepOne Plus Real time PCR Cycler (Applied Biosystems) durchgeführt. Das PCR-Programm ist in Tabelle 2. 7 angegeben. Mit den gemessenen CT-Werten aus der qPCR wurden die Prozent-Input-Werte anhand folgender Formel: $100 \times 2^{(CT_{100 \% \text{ Input}} - CT_{\text{ChIP-IP}})}$ berechnet.

Tabelle 2. 5: Reagenzien und Volumenangaben der PCR-Reaktion.

Reagenz (pro Ansatz)	μl
SYBR Green Mix (2x)	12,5
Forward Primer (10pmol/μl)	0,25
Reverse Primer (10pmol/μl)	0,25
H₂O, RNase frei	12

Tabelle 2. 6 Übersicht der verwendeten ChIP-Primer für die qRT-PCR Messung.

Gen		Nukleotidsequenz (5'→3')	T _m [°C]	Primerlänge [bp]
GAPDH Exon 6	for	GCCAAGGCTGTGGGCAAGGT	63,5	20
	rev	CCTCCGACGCCTGCTTCACC	65,5	20
TSP1	for	AAGCAGCTGTCCTCCCCGGG	65,5	20
	rev	GGGCCACAGAGACGCCTCT	65,5	20
CD41	for	TCAGCCATGAGCATCCACCCTCT	56,5	23
	rev	TGCTGAGCAACGGGCAGAGCAAA	56,5	23
BCL6	for	GTCCTAGCATCTGGTCAGGG	61,4	20
	rev	GGGTAGGGATCGGTGTGGAA	61,4	20
CDKN1B	for	ACAAAGCTCAGTGGATCTTCAAC	58,9	23
	rev	TAGAACGGAAGGTTGGTTTCCAG	60,6	23
CDKN1B P1	for	CAACCGAATGCATGTCCCTG	59,4	20
	rev	AATGTGACAGCTGGAAGGGA	57,3	20
CDKN1B P2	for	ATCTGGAGTTTGACCCCGAG	59,4	20
	rev	AACAGCTCCTTCCTTCCTCC	59,4	20
CDKN1B P3	for	CGCGTCTACTCCTGGCTAAT	59,4	20
	rev	TTCGCTCAGCCTTAACCCAG	59,4	20
CDKN1B P4	for	CCGTTTGGCTAGTTTGTTTGTC	58,4	22
	rev	CCGGGAGATTGGCTGGTC	60,5	18

CDKN1B P5	for	GACCAGCCAATCTCCCGG	60,5	18
	rev	AGGAGATCCATTGGTTGCGG	59,4	20

Tabelle 2. 7: PCR-Programm für die Analyse der ChIP-DNA.

PCR-Programm	Temperatur	Dauer	Zusätzliche Angaben
Aktivierung der Polymerase	95 °C	5 Min	Keine Messung
Denaturierung	95 °C	20 Sek	55 Zyklen
Annealing	60 °C	20 Sek	
Elongation	72 °C	20 Sek	
Messung	78 °C	1 Sek	Messung
Letzte Denaturierung vor Schmelzkurve	95 °C	5 Sek	Keine Messung
Beginn der Schmelzkurve	60 °C → 95°C	1 min	Kontinuierliche Messung, pro 1 °C → 5 Messungen

2.2.7 Sequentieller ChIP (ChIP-ReChIP)

Die Methode des sequentiellen ChIPs oder auch ChIP-ReChIP genannt, wird verwendet um eine gleichzeitige Bindung zweier Transkriptionsfaktoren an einem regulatorischen Element nachzuweisen (Geisberg & Struhl, 2004). Das Prinzip dieses ChIPs beruht auf zwei Chromatin-Immunopräzipitationen, die nacheinander mit Antikörpern, die gegen die zwei zu untersuchenden Transkriptionsfaktoren gerichtet sind, erfolgen. Die Zelllysate, die Sonifizierung und die Immunopräzipitation mit dem ersten Antikörper wurden, wie in Kapitel 2.2.6 beschrieben, durchgeführt. Nach der Inkubation über Nacht werden die beads viermal mit Waschpuffer I gewaschen und anschließend durch die Zugabe von 50 µl Elutionspuffer I für eine Stunde bei Raumtemperatur eluiert und alle 15 Minuten gevortext. Die Proben werden herrunterzentrifugiert, drei gleiche Ansätze für die zweite Immunopräzipitation vereint und Inkubationspuffer ad 800µl hinzugegeben. Der zweite Antikörper und die blockierten beads werden zu den Proben pipettiert und der Ansatz über Nacht inkubiert. Danach erfolgen die weiteren Wasch- und Elutionsschritte, so wie zuvor in Kapitel 2.2.6 beschrieben. Eluiert werden die Proben jedoch nach dem Waschen in Elutionspuffer II. Dann wird mit den Proben wie zu vor in Kapitel 2.2.6 beschrieben, weiter verfahren.

Lysepuffer:

50 mM Tris-HCl pH 7,5; 140 mM NaCl; 1 mM EDTA pH 8; 1% Triton X-100; 0,1% Natrium-Deoxycholat; 0,4% SDS

RIPA-Puffer (ohne SDS):

50 mM Tris-HCl pH 7,5; 150 mM NaCl; 2 mM EDTA pH 8; 1% NP-40; 0,5% Natrium-Deoxycholat

Waschpuffer:

20 mM Tris-HCl pH 7,5; 150 mM NaCl; 2 mM EDTA pH 8; 1% Triton X-100; 0,1% SDS

Inkubationspuffer:

50 mM Tris-HCl pH 7,5; 150 mM NaCl; 1% NP-40; 0,25% Natrium-Deoxycholat

Elutionspuffer I:

50 mM Tris-HCl pH 7,5; 0,5% SDS; 15 mM DTT (frisch zugeben)

Elutionspuffer II:

1% SDS; 100 mM NaHCO₃

2.3 Molekularbiologische Methoden

2.3.1 Herstellen von Vektoren

In dieser Arbeit wurden verschiedene Vektoren verwendet (siehe Tabelle 2. 8). Ein Teil dieser verwendeten Vektoren wurden kloniert.

Tabelle 2. 8 Übersicht der verwendeten Vektoren.

Gen/ Konstrukt	Ausgangsvektor	Verwendetes Assay
shLacZ	SEW	<i>Knockdown</i> -Experimente
shPRMT6 #1	SEW	<i>Knockdown</i> -Experimente
shPRMT6 #2	SEW	<i>Knockdown</i> -Experimente
LeGOiG2 (Leervektor)	LeGOiG2	Überexpressionsexperimente
PRMT6	LeGOiG2	Überexpressionsexperimente
CDKN1B (877bp)	pGL4.10 (luc2)	Reportergen-Experimente
CDKN1B (1156bp)	pGL4.10 (luc2)	Reportergen-Experimente
CDKN1B (529bp)	pGL4.10 (luc2)	Reportergen-Experimente
CDKN1B (235bp)	pGL4.10 (luc2)	Reportergen-Experimente

RUNX1	2HA-pcDNA3	Reportergen-Experimente
RUNX1 mut	2HA-pcDNA3	Reportergen-Experimente
2HA-pcDNA3 (Leervektor)	2HA-pcDNA3	Reportergen-Experimente

Der SEW-Vektor (Demaion et al, 2002) wird für die Transduktion von eukaryotischen Zellen zur Expression einer shRNA verwendet (siehe Abbildung 2. 1).

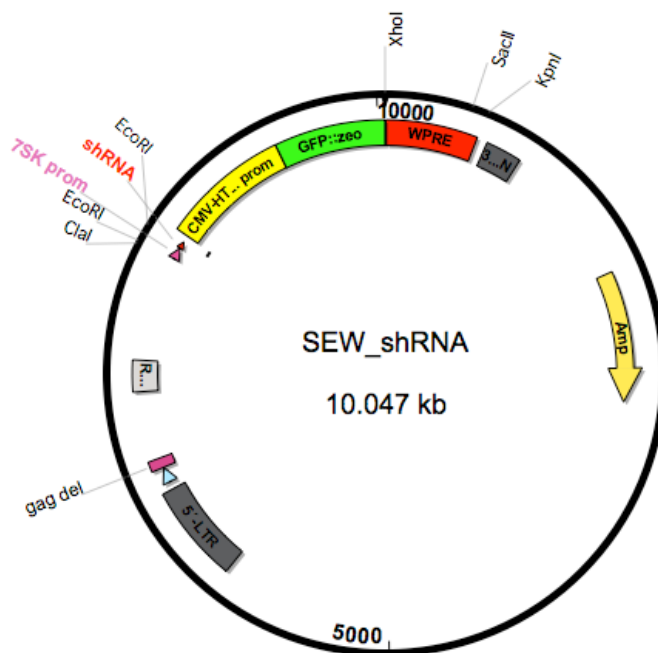


Abbildung 2. 1: Vektorkarte des lentiviralen Vektors SEW-shRNA. Es werden ebenfalls wichtige Schnittstellen angezeigt.

Modifiziert nach Demaion et al (2002).

Der Vektor beinhaltet einen CMV (Cytomegalovirus)-Promotor und eine GFP:Zeocin-Kassette. Diese wurde aus dem psiRNA-7hSK-Vektor in diesen Vektor kloniert und ist zur Expressions-Kontrolle geeignet. Die Zeocin-Resistenz eignet sich zur Selektion transduzierter Säugerzellen. Die in diese Arbeit verwendeten shRNA-Konstrukte (shPRMT6 #1 und shPRMT6 #2) wurden von Julia Herglotz kloniert. Als Kontrolle für die *Knockdown*-Experimente diente eine shRNA gegen das LacZ-Gen, um Effekte durch die Transduktion auszuschließen.

Der LeGOiG2-Vektor (Weber et al, 2008) kann sowohl für eine transiente Transfektion als auch für eine Transduktion von Säugerzellen verwendet werden, um das gewünschte Protein zu exprimieren (siehe Abbildung 2. 2). Zudem beinhaltet der Vektor einen SFFV (*spleen focus-forming virus*)-Promotor, der sich gut für eine Überexpression eignet und eine Variante des grün fluoreszierenden Proteins (EGFP). Außerdem ist die Ampicillin-Resistenz auf dem Vektor zur Selektion in Bakterien von Bedeutung. In diesen Vektor wurde die cDNA des hu-

manen PRMT6 kloniert mittels PCR-Amplifikation mit Primern, die die Restriktionsschnittstellen für BamHI und NotI besitzen.

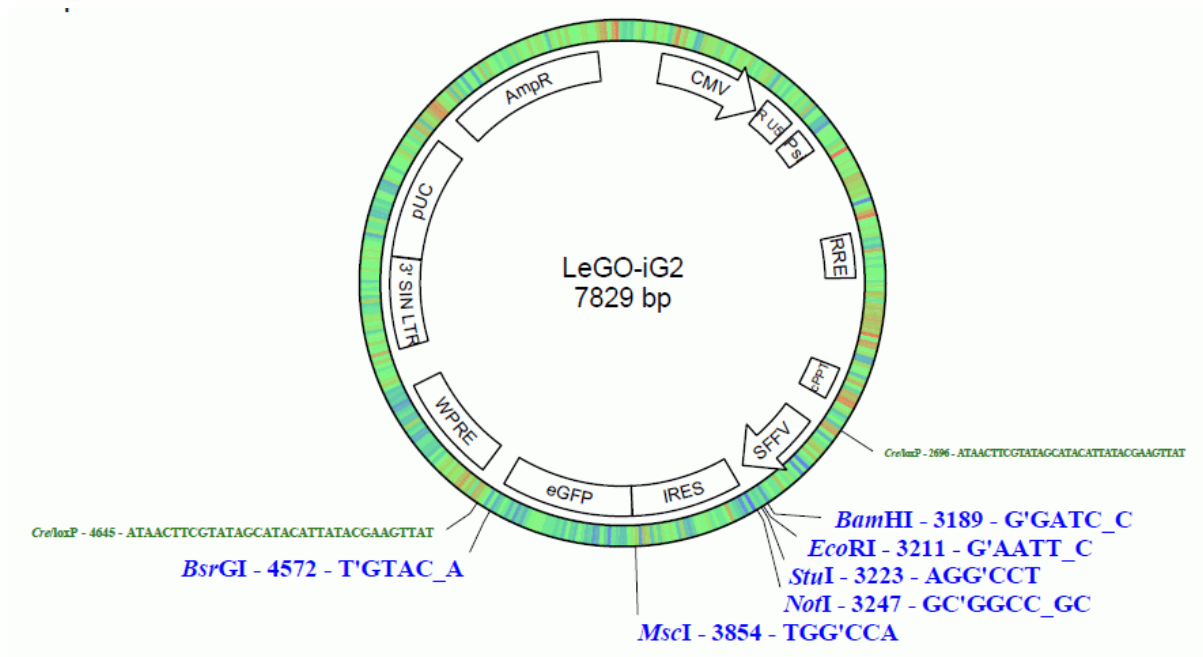


Abbildung 2. 2: Vektorkarte des lentiviralen Vektors LeGOiG2. Es werden ebenfalls die Schnittstellen angezeigt, die nur einmal in dem Vektor schneiden. Modifiziert nach Weber et al (2008).

Der Vektor pGL4.1 (Promega, Madison) ist für die transiente Expression in eukaryontischen Zellen geeignet (siehe Abbildung 2. 3). Dabei ist die die Firefly-Luciferase (luc2) als Reportergen ohne Promotorfragment enthalten. Vor dem Luciferase-Gen können jedoch durch Restriktionsschnittstellen Promotorkonstrukte kloniert werden, sodass die Expression der Luciferase abhängig von dem Promotor-Fragment ist. Für diese Arbeit wurde ein 1156bp, 877bp, 529 bp und ein 235bp großes Promotor-Fragment des *CDKN1B*-Promotors kloniert. Diese Fragmente wurden mittels Primer, die auch die Restriktionserkennungssequenzen enthielten, amplifiziert und durch Restriktion und anschließender Ligation vor das Luciferase-Gen kloniert. Die Veränderungen in der Luciferase-Expression und infolgedessen die Aktivität des Promotors kann mit einem Luciferase-Reportergen-Assay gemessen werden.

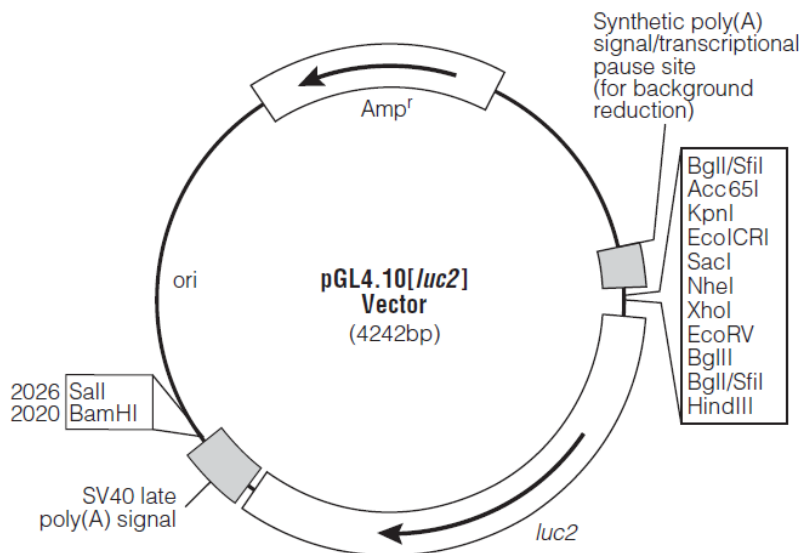


Abbildung 2. 3: Vektorkarte des Luciferase-Reportergen-Vektors pGL4.10 (luc2). Die enzymatischen Schnittstellen der MCS sind ebenfalls abgebildet.

Der 2HA-pcDNA3-Vektor ist ein Expressionsvektor für Proteine, der einen CMV-Promotor enthält. Die Konstrukte, die in dieser Arbeit verwendet wurden, wurden von Helge Hussong und Olga Lausen kloniert. Diese Konstrukte wurden zur Kotransfektion in einem Luciferase-Reportergen-Assay verwendet.

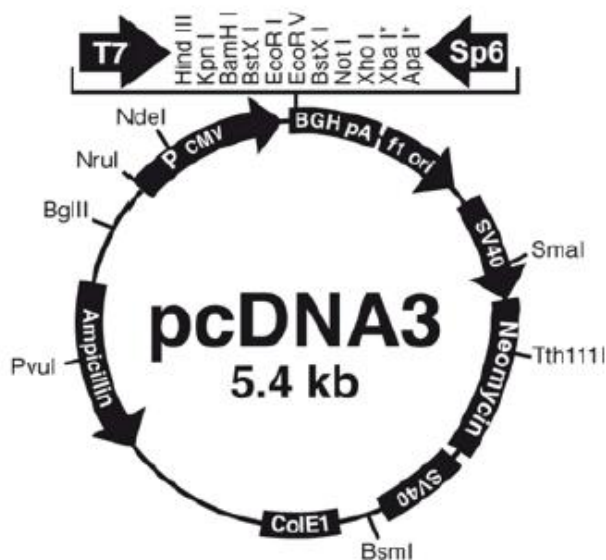


Abbildung 2. 4: Vektorkarte des Expressionsplasmids 2HA-pcDNA3. Quelle: Life Technologies (Darmstadt)

2.3.2 Polymerase-Kettenreaktion

Die Polymerase Kettenreaktion ist eine weit verbreitete enzymatische Methode für die *in vitro* Amplifikation definierter DNA-Abschnitte (Saiki et al, 1988). Der zu amplifizierende DNA-Bereich wird durch zwei Oligonukleotidprimer flankiert, die nach einer Hitzedenaturierung der doppelsträngigen DNA binden können. Die Vervielfältigung der DNA beruht auf einem Zyklus aus drei Schritten. Bei der Denaturierung bei einer Temperatur von 95°C trennen sich die beiden komplementären Stränge. Durch das Herabsetzen auf die Hybridisierungstemperatur (*Annealing*), die für jedes Primerpaar spezifisch ist, binden die Primer an die DNA. An diesen Stellen beginnen die Polymerasen damit, weitere komplementäre Nukleotide an die DNA zu synthetisieren. Für diesen Verlängerungsschritt (*Elongation*) wird die hitzestabile DNA-Polymerase (*Phusion* Polymerase) des Archaeobakteriums *Thermus aquaticus* benötigt (Chien et al, 1976). Diese synthetisiert bei ihrer optimalen Temperatur von 75°C die DNA. Durch einen Zyklus dieser drei Schritte wird eine potentielle Vermehrung des DNA-Fragments möglich. Die Reaktionsbedingungen müssen für jedes Primerpaar individuell optimiert werden, um ein spezifisches PCR-Produkt zu erhalten. Die zu variierenden Parameter betreffen hierbei vor allem die Magnesiumchlorid-Konzentration, DMSO-Konzentration und die *Annealing*-Temperatur. Bei jeder PCR wird eine Negativ-Kontrolle (H₂O-Kontrolle) mitgeführt, um mögliche Kontaminationen auszuschließen.

In dieser Arbeit werden verschiedene Arten von PCRs durchgeführt. Darunter gehören die Mutagenese-PCR von Vektoren und die PCR zur Klonierung von Konstrukten.

2.3.3 Agarosegelelektrophorese

Mit Hilfe der Agarose-Gelelektrophorese werden Nukleinsäurestränge der Größe nach aufgetrennt. Die Nukleinsäuren migrieren aufgrund der negativen Ladung des Zucker-Phosphat-Rückgrates im elektrischen Feld zur Anode. Durch die Agarose werden sie anhand ihrer Größe und Konformation aufgetrennt. Je größer das DNA Fragment ist, desto geringer ist die Wanderungsgeschwindigkeit im Agarosegel. Für DNA-Fragmente bis zu einer Größe von 500 bp wurden 2%ige Gele genutzt, während sich bei Fragmenten von 0,5-7 kb am besten 1%ige Gele eigneten. Zur Herstellung der Agarosegele wurden die bestimmten Mengen an Agarose in 1 x TAE-Puffer aufgekocht und dann mit 2,5 µl Ethidiumbromid versetzt. Anschließend wurde das flüssige Gel in eine, mit Kämmen bestückte, Gelkammer gegossen. Nachdem das Gel polymerisiert war, konnte es mit den Proben beladen werden. Die Proben wurden mit Ladepuffer versetzt, um ein Einsenken der Probe in die Tasche zu erleichtern. Um die Produktgröße der DNA-Fragmente zu bestimmen, wurde ein Längenstandard mitge-

führt. Die Auftrennung erfolgte in 1 x TAE-Puffer bei 170-200 Volt. Die Detektion der Nukleinsäuren im Gel konnte durch UV-Licht ermöglicht werden, da Ethidiumbromid nach Interkalation in die DNA sein Absorptionsspektrum verändert. Die gebildeten DNA/-Ethidiumbromid-Komplexe erschienen durch UV-Licht als eine rot/orange Fluoreszenz.

(50x) TAE-Puffer:
2 M Tris; 1 M Essigsäure; 50 mM EDTA (pH 8,0)

2.3.4 Aufreinigung von PCR-Produkten und von DNA aus Agarose-Gelen

Für diese Methode wurde das Kit „GeneJet PCR Purification Kit“ von ThermoFisher verwendet, um Pufferreste und Salze aus PCR-Ansätzen zu entfernen und DNA-Fragmente aus den Agarosegelen zu extrahieren.

Bei einer Gelextraktion wurde die gewünschte DNA aus ausgestochenen Gelstücken isoliert. Dafür wurde zuerst der präparative Verdau geleelektrophoretisch aufgetrennt. Durch das vorgefertigte System NucleoSpin® Extract II von Macherey-Nagel wurde die DNA dann nach Herstellerangaben aus dem Gel isoliert.

2.3.5 Bestimmung der DNA-Konzentration

Die DNA-Konzentration wurde mit Hilfe eines Spektrophotometers NanoDrop 1000 bei einer Wellenlänge von 260nm gemessen. Wenn das Verhältnis von OD_{260} / OD_{280} etwa 1,8 entsprach, konnte von einer nicht verunreinigten DNA gesprochen werden.

2.3.6 Ligation

Eine Ligation wurde durchgeführt, um einen linearisierten Vektor mit dem entsprechenden Insert mit kompatiblen Enden zu verknüpfen. Durch die T4 DNA-Ligase (Thermo Fisher) kommt es zur Ausbildung einer Phosphodiesterbindung zwischen dem 3'Hydroxy- und dem 5'Phosphat-Ende. Dabei wird ATP als Kofaktor benötigt. Die gewünschte Orientierung des Inserts ist durch den Verdau mit zwei verschiedenen Enzyme gewährleistet. Die Insert-DNA wurde, je nach Insertlänge, im Vergleich zur Vektor-DNA in einem 3- bis 7-fachen molaren Überschuss in die Reaktion eingesetzt. Diese Methode wurde, wie nach Hersteller-Angaben beschrieben, durchgeführt.

Tabelle 2. 9: Übersicht über den Ligationsansatz.

Reagenz	Mengenangaben
Gesamt-DNA	0,1-0,5 µg
T4-DNA-Ligase (5 U/µl)	1 µl
Ligase-Puffer (10x)	1 µl
ddH ₂ O	ad 10 µl

2.3.7 Transformation von Bakterien

Die Transformation ist die nicht-virale Aufnahme von freier DNA in kompetente Bakterienzellen. Diese Methode wird verwendet, um rekombinante DNA zu vervielfältigen. In dieser Arbeit wurden die kompetenten *E. coli* Top10, GT118 und DH5α benutzt und durch Hitzeschock zur Aufnahme des Plasmids gebracht. Vor der Transformation wurden kompetente *E. coli*-Bakterien hergestellt. Dies erfolgte mit Hilfe des „Roti-Transform Kits“ (Carl Roth) nach Herstelleranweisungen. Die kompetenten Bakterien wurden sofort eingefroren und bei -80°C gelagert und direkt vor der Transformation auf Eis aufgetaut.

Nach dem Auftauen von 200 µl der *E. coli* wurden 5-10 µl des Ligationsproduktes hinzupipettiert. Anschließend wurde vorsichtig das Reaktionsgefäß angeschnipst und der Ansatz für 30 min auf Eis inkubiert. Danach folgte der Hitzeschock bei 42°C im Wasserbad und das wieder Abkühlen auf Eis für 2 min. Als nächstes wurden 250 µl des vorgewärmten LB-Mediums (ohne Zusätze) hinzupipettiert und dann 1 h bei 37°C und 200 rpm auf dem Schüttler inkubiert. Schlussendlich konnten die transformierten Bakterien auf LB-Agar-Platten ausplattiert werden und die Inkubation der Platten bei 37°C über Nacht in einem Bakterien-Brutschrank erfolgen.

LB-Medium:

1% (w/v) Bacto-Trypton; 0,5% (w/v) Hefeextrakt; 1% (w/v) NaCl

Agar:

1,5% (w/v) Bacto-Agar in LB-Medium

2.3.8 Kultivierung von Bakterien

Kultivierung von flüssigen Bakterienkulturen erfolgte in LB-Medium unter Zugabe entsprechender Antibiotika (Tabelle 2. 10) bei 37°C in einem Bakterien-schüttler (200 rpm). Um einzelne Bakterienkolonien zu erhalten, wurden die Bakterien auf LB-Agar-Platten unter Zugabe entsprechender Antibiotika in einem Bakterienbrutschrank bei 37°C inkubiert.

Es wurden folgende Antibiotika genutzt.

Tabelle 2. 10: Übersicht der verwendeten Antibiotika.

Antibiotika	Endkonzentration
Ampicilin	100 µg/ml
Kanamycin	100 µg/ml

2.3.9 Plasmidpräparation

Die Isolation der Plasmide ist für eine Reihe nachfolgender Experimente von Bedeutung, wie die Transfektion und Transduktion oder Überprüfung der klonierten Konstrukte. Für die Präparation der Plasmide wurde einmal eine Minipräparation oder auch eine Midipräparation durchgeführt.

Die Minipräparation erfolgte aus einer 3 ml-Bakterienkultur, die zuvor über Nacht bei 37°C schüttelnd inkubierte. Die Isolation der DNA aus den Bakterien erfolgte mit dem Kit GeneJet Plasmid Minipreps Kit (Thermo Fischer) nach Herstellerangaben. Jedoch wurde die DNA nicht mit dem Elutionspuffer, sondern mit 40 µl Wasser eluiert. Anschließend konnte die Sequenz des klonierten Konstrukts mittels Sequenzierung überprüft werden (siehe 2.3.10).

Die Midipräparation erfolgte aus einer größeren Bakterienkultur. Am Vorabend wurden 100 ml LB-Medium mit einer Vorkultur angeimpft und über Nacht bei 37°C schüttelnd inkubiert. Die Präparation wurde mittels PureLink HiPure Plasmid Midiprep Kit von Invitrogen nach Vorgaben des Herstellers durchgeführt. Die aufgereinigte DNA wurde in 200 µl TE-Puffer eluiert.

2.3.10 Sequenzierung

Um die Sequenz verschiedener Plasmide zu ermitteln, wurde der Sequenzierungsservice im Georg-Speyer-Haus genutzt. Es wurden die Primer der Firma Eurofins MWG Operon verwendet. Für die Sequenzierung wurde 0,5-1,0 µg DNA (Mini oder Midipräp) und 50 µM Primer eingesetzt. Des Weiteren wurde der Sequenzierungsservice der Firma GATC Biotech verwendet. Dabei wurden die Proben für die *light run* Sequenzierung vorbereitet, bei der etwa 500 ng DNA und 25 µM der Primer benötigt wurde.

2.3.11 RNA-Isolierung

Für die Isolation der RNA aus humanen Zellen wurden die Zellen zweimal mit PBS gewaschen. Anschließend wurde die RNA-Isolation aus $1-5 \times 10^6$ Zellen mittels des RNeasy Mini Kits nach Angaben des Herstellers durchgeführt. Die RNA wurde in 20-50 μl RNase-freiem Wasser eluiert.

Vor der Umschreibung der RNA in cDNA musste die RNA einer DNase-Behandlung unterzogen werden, um eventuell vorhandene Kontaminationen durch DNA zu entfernen. Im Folgenden ist der Ansatz für den DNase-Verdau aufgeführt:

Tabelle 2. 11: Übersicht über den DNase-Verdau-Ansatz.

Reagenz	Volumen [μl]
RNA	20 – 50
MgCl ₂ (50 mM)	0,5 – 1
DNase I, RNase-frei (3 U/ μl)	1,0
RNase-Inhibitor RiboLock (40 U/ μl ; 1:4 in RT-Puffer)	0,55 -1

Dieser Ansatz wurde für 30 min bei 37°C und anschließend 10 min bei 72°C inkubiert, um das Enzym durch Hitze zu inaktivieren.

Der Erfolg der DNase-Behandlung wurde mittels –RT-PCR überprüft. Das heißt, es wird eine RT-PCR mit der DNase-behandelten RNA, die noch nicht in cDNA umgeschrieben ist, durchgeführt.

Die RNA-Konzentration wurde an dem Spektrophotometer NanoDrop bei einer Wellenlänge von 260 nm gemessen.

2.3.12 Quantitative *real-time*-PCR

Um die Expression eines Gens zu untersuchen, musste zunächst die RNA aus den Zellen isoliert werden (siehe 2.3.11). Anschließend erfolgte die Umschreibung der mRNA in cDNA mit Hilfe der reversen Transkriptase-PCR mit einer darauffolgenden quantitativen *real-time* PCR (qPCR).

Zur Umschreibung der RNA (pro Reaktion 1 μg) in doppelsträngige cDNA wurde das „Omniscript Reverse Transkriptase“-Kit von Qiagen verwendet. Um die Umschreibung der Gesamt-RNA der Zellen zu gewährleisten, wurde ein Primer-Mix aus zufällig zusammenge-

setzten Hexanukleotiden von Carl Roth verwendet. Der Reaktionsansatz (siehe Tabelle 2.12) wurde anschließend für 60 min bei 37°C inkubiert.

Tabelle 2. 12: Übersicht über die Volumenangaben der reversen Transkriptionsreaktion.

Reagenz	Volumen
RT-Puffer	2 µl
dNTP-Mix (5mM jeder dNTP)	2 µl
Hexanukleotid-Random-Primer-Mix	2 µl
RNase-Inhibitor RiboLock (40 U/µl, 1:4 in RT-Puffer)	0,5 µl
Omniscript reverse Transkriptase (4 U/µl)	1 µl
RNA	200 ng – 1000 ng
H ₂ O, RNase-frei	ad 20 µl

Die quantitative *real-time* PCR (q-rtPCR) ist eine Vervielfältigungsmethode für Nukleinsäuren, die auf dem Prinzip der herkömmlichen Polymerase-Kettenreaktion (PCR) beruht. Bei der q-rtPCR wird das zu untersuchende DNA-Fragment nicht nur amplifiziert, sondern auch quantifiziert. In dieser Arbeit wird die Quantifizierung der amplifizierten DNA mit Hilfe des Fluoreszenzfarbstoffes SYBR-Green detektiert. SYBR-Green ist ein Fluoreszenzfarbstoff, der in der kleinen Furche doppelsträngiger DNA bindet. Der daraus entstandene DNA-Fluoreszenzfarbstoff-Komplex absorbiert blaues Licht bei einer Wellenlänge von $\lambda_{\text{max}}=494$ nm und emittiert Licht mit einer Wellenlänge von 521 nm. Die Fluoreszenz nimmt proportional mit der Menge der PCR-Produkte zu. Am Ende eines Laufes wird die Quantifizierung anhand von erhaltenen Fluoreszenzsignalen in der exponentiellen Phase der PCR vorgenommen. Für die Quantifizierung wird das Referenz-Gen *GAPDH* mitgeführt, um einen relativen Mengen-Vergleich durchzuführen. Die korrekte Quantifizierung ist nur in der exponentiellen Phase der PCR möglich, da in dieser Phase die optimalen Reaktionsbedingungen vorhanden sind. Am Ende eines jeden Laufes wird eine Schmelzkurvenanalyse durchgeführt, um zu überprüfen, ob nur ein spezifisches PCR-Produkt entstanden ist. Dabei wird durch die kontinuierliche Erhöhung der Temperatur von 60°C auf 98°C die DNA aufgeschmolzen. Die Schmelzkurve dient der Überprüfung der Spezifität des Produkts anhand der Fragmentlängen, da spezifische PCR-Produkte einen höheren Schmelzpunkt haben, als z.B. unspezifische Primerdimere. Bei der Auftrennung des PCR-Produkts wird der Fluoreszenzfarbstoff freigesetzt und anschließend kann eine Fluoreszenzabnahme gemessen werden. Die qRT-PCR wurde nach Angaben des Herstellers mit dem LightCycler480 von Roche (Mannheim) durchgeführt (siehe Tabelle 2. 14). Der jeweilige qPCR-Ansatz wurde als Triplikat, wie in Tabelle 2.13 beschrieben, pipettiert und zeigt die Volumenangaben pro Ansatz.

Die Messung erfolgte in 96-well-Platten (Quali-PCR-Platten, weiß, #GK480K-BC, Kisker), welche anschließend für 1 min zentrifugiert wurden.

Tabelle 2. 13: Übersicht der Volumenangaben für die qRT-PCR-Reaktion.

Reagenz	Volume [μ l]
SYBR Green Mastermix	12,5
forward Primer (10 μ M)	0,5
reverse Primer (10 μ M)	0,5
H ₂ O, RNase frei	11,5

Tabelle 2. 14: Übersicht des PCR-Programms der qRT-PCR.

Programmschritt	Dauer	Temperatur	Anmerkung
Initiale Denaturierung	5 min	95	Keine Messung
Denaturierung	25 sec	95	Zyklen 50
Annealing	25 sec	58/60	
Elongation	20 sec	72	
Schmelzkurve	30 min	60°C-98°C	Kontinuierliche Messung, 5 Aufnahmen pro 1°C

Die Berechnung der relativen Expressionsveränderung ($2^{-\Delta\Delta C_T}$) erfolgte nach der $\Delta\Delta C_T$ Quantifizierungs-Methode (Pfaffl, 2001) (Pfaffl 2001, Livak et al 2001). Zur Normalisierung wurde die Transkription des Gens der *Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase* (GAPDH) als Referenz verwendet. Die relative mRNA-Expression in Kontroll-Zellen wurde als 1 gesetzt und die Werte der Bezugsgene relativ dazu berechnet.

Folgende Primerpaare wurden für die *real-time* PCR verwendet (siehe Tabelle 2. 15).

Tabelle 2. 15: Übersicht der verwendeten Primer für die qRT-PCR-Messung.

Gen		Nukleotidsequenz (5'→3')	T _m [°C]	Primerlänge [bp]
GAPDH	for	TCTTTTGCCTCGCCAGCCGAGC	65,8	22
	rev	TGACCAGGCGCCCAATACGACC	65,8	22
PRMT6	for	TCTGGTTCCAGGTGACCTTC	59,4	20
	rev	AGGTAGAGGAGCGCCTGTTT	59,4	20

CDKN1B	for	ATGTCAAACGTGCGAGTGTC	57,3	20
	rev	TCTCTGCAGTGCTTCTCCAA	57,3	20
CDKN2D	for	CTGCAGGTCATGATGTTTGG	57,3	20
	rev	CGTGCTCCACTAGGACCTTC	61,4	20
BMF	for	GGAGCTGGAGGATGATGTGT	59,4	20
	rev	AAGAGCTGAAGTCGGCTGAG	59,4	20
BTG2	for	AAGATGGACCCCATCATCAG	57,3	20
	rev	CGTACAAGACGCAGATGGAG	59,4	20
MECOM	for	GTACCACAGGCCTCCTTTGA	59,4	20
	rev	GGAGCTCCACTGGCTTATTG	59,4	20
TSP1	for	CAATGCCACAGTTCCTGATG	57,3	20
	rev	TGGAGACCAGCCATCGTC	58,2	18
GYPA	for	CCCTCCAGAAGAGGAAACCGGA GA	66,1	24
	rev	GGCACGTCTGTGTCAGGTGAGG	65,8	22
ALAS2	for	ACTCTCTTCACCTTGGCCAA	57,3	20
	rev	AGGGTCATTGTGCCTGAAGA	57,3	20
AHSP	for	TGGTGGAGGACTGGATGAAC	59,4	20
	rev	GTTGGCCAGAGTGTTACGC	58,8	19
SPTA1	for	GAGTGTAGCGCTTGTGATGG	59,4	20
	rev	ACTGGCCTCATTGAGCTTCT	57,3	20
β-Globin	for	CCACTCCTGATGCTGTTATG	57,3	20
	rev	CAGGAGCCTGAAGTTCTCAG	59,4	20
KLF1	for	GTGATAGCCGAGACCGCGCC	65,5	20
	rev	TTCTCCCCTGTGTGCGTGCG	63,5	20
EPB49	for	ACCCTTCCATACCTCCTTGC	59,4	20
	rev	CCAGTCTCACTCCCTGATGG	61,4	20
EPB41L4A	for	TGGCCTCGGATTACAAAGGT	57,3	20
	rev	CTTCCAGAGGTGCTTGCAAG	59,4	20

2.4 Zellbiologische Methoden

2.4.1 Kultivierung, Passagieren und Aufbewahrung von Zelllinien

In dieser Arbeit wurden verschiedene Leukämie-Zelllinien verwendet. Dabei handelte es sich um K562, TF-1, Jurkat, HEL, HL-60, Kasumi-1, SKNO-1 und U937, die unter verschiedenen Bedingungen kultiviert wurden. Des Weiteren wurde mit der Nierenzelllinie HEK293T und deren Subklon HEK293T/17 gearbeitet. Die Kulturbedingungen der verwendeten Zelllinien und ihre Charakteristika sind in Tabelle 2. 16 dargestellt.

Tabelle 2. 16: Charakteristika und Kulturbedingungen der verwendeten Zelllinien.

Zelllinie	Charakteristik	Medium	Zusätze	Quelle
HEL	Humane erythroide Zelllinie, Zelltyp: Erythroblast, Krankheit: Erythroleukämie	RPMI	10% FCS	ATCC TIB-180
HL-60	Zelltyp: Promyeloblast, Krankheit: akute promyeloische Leukämie	RPMI	10% FCS	DSMZ: ACC 3
Jurkat	Zelltyp: Lymphozyten, Krankheit: akute T-Zell-Leukämie	RPMI	10% FCS	DSMZ: ACC 282
K562	Zelltyp: Lymphoblast, Krankheit: chronische myeloische Leukämie (CML)	RPMI	10% FCS	DSMZ: ACC 10
Kasumi-1	Zelltyp: Myeloblast, Krankheit: akute myeloische Leukämie	RPMI	20% FCS	DSMZ: ACC 220
SKNO-1	Zelltyp: Myeloblast, Krankheit: akute myeloische Leukämie	RPMI	10% FCS, 10 ng/ml GM-CSF	DSMZ: ACC 690
U937	Zelltyp: Monozyten, Krankheit: histozytisches Lymphom	RPMI	10% FCS	DSMZ: ACC 5
TF-1	Zelltyp: Erythroblast, Krankheit: Erythroleukämie	RPMI	20% FCS	ATCC CRL-2003

HEK293T	Epitheliale embryonische Nierenkarzinomzelllinie	DMEM	10% FCS	ATCC CRL-3216
HEK293T/17	Subklon Nummer 17 der HEK293T, welcher in der Lage ist hohe Titer an Viruspartikel zu produzieren	DMEM	10% FCS	ATCC CRL-11268G-1

Die Kultivierung der verschiedenen Zelllinien erfolgte mit dem spezifischen Medium im Brutschrank bei einer Temperatur von 37°C, 95%iger relativer Luftfeuchtigkeit und 5% CO₂. Die verwendeten Medien wurden zusätzlich zu den Zusätzen, die in Tabelle 2. 16 beschrieben sind, mit 1% Penicillin/Streptomycin (PAA, Pasching) und 2 mM L-Glutamin (PAA, Pasching) versetzt. Zum Einfrieren der Zellen wurden etwa 5×10^6 Zellen abzentrifugiert und in 1 ml FCS mit 10% DMSO resuspendiert. In einem Cryo-Einfriergefäß mit Hilfe einer Cryobox wurden die Zellen langsam (etwa 1°C pro min) auf -80°C abgekühlt. Die dauerhafte Aufbewahrung erfolgte dann anschließend im flüssigen Stickstoff. Die eingefrorenen Zellen können wieder in Kultur genommen werden, wenn sie zunächst bei 37°C aufgetaut und mit vorgewärmtem Medium versetzt werden. Nach der anschließenden Zentrifugation konnten die Zellen in neuem Medium resuspendiert und in eine Kulturschale überführt werden.

2.4.2 Isolierung von primären hämatopoetischen Zellen

Die Isolierung hämatopoetischer Stammzellen erfolgte entweder aus Material von Knochenmarkspendern oder aus Blutproben von gesunden Spendern, bei denen die Stammzellen durch G-CSF mobilisiert wurden. Diese Präparate wurden freundlicherweise von der Arbeitsgruppe um Professor Dr. Halvard Bönig aus dem Blutspendedienst Frankfurt bereitgestellt. Um eine Trennung der mononukleären Zellen von Erythrozyten und Thrombozyten zu erreichen wurde zunächst eine Dichtegradienten-Zentrifugation mittels Ficoll durchgeführt. Anschließend konnten die Zellen entnommen und gewaschen werden. Von dieser Zellsuspension konnten dann anschließend mit dem CD34+ Microbead Kit (Milenyi Biotec) die CD34+-Stammzellen durch Positivselektion isoliert werden. Die Durchführung erfolgte nach Herstellerangaben. Die Reinheit der isolierten CD34+-Zellen wurde mittels FACS (2.4.8) bestimmt. Nach der Überprüfung konnten die Zellen anschließend direkt kultiviert oder mit dem Ein-

friermedium CryoStor CS10 (Stemcell Technologies) weggefroren und im Stickstofftank gelagert werden.

2.4.3 Kultivierung und Differenzierung humaner hämatopoetischer Stammzellen

Die humanen CD34+-Zellen wurden in dem Serum-freien Medium SFEM StemSpan (Stemcell Technologies) unter Zugabe von verschiedenen Zytokinen kultiviert. Die CD34+-Zellen wurden etwa mit einer Zelldichte von 5×10^5 Zellen/ml gehalten. Das Expansionsmedium setzte sich wie folgt zusammen (siehe Tabelle 2. 17).

Tabelle 2. 17: Übersicht der verwendeten Zytokine für die CD34+-Expansion.

Bezeichnung	Konzentration
Humaner rekombinanter Stammzellfaktor (hSCF)	100 ng/ml
Humaner rekombinanter Flt-3 – Ligand	100 ng/ml
Humanes Interleukin-3 (IL-3)	20 ng/ml
Humanes Interleukin-6 (IL-6)	20 ng/ml

In dieser Arbeit wurden die CD34+-Zellen in verschiedene Richtungen differenziert.

Die Differenzierung der CD34+-Zellen in Richtung der Erythrozyten erfolgte in dem SFEM II StemSpan-Medium (Stemcell Technologies), welches mit verschiedenen Zytokinen und Chemikalien versetzt wurde (siehe Tabelle 2. 18). Die Differenzierung in die erythroide Richtung erfolgte für etwa 9 Tage (Mahjan *et al.*, 2009).

Tabelle 2. 18: Übersicht der verwendeten Zytokine und Chemikalien als Zusatz für die Differenzierung von CD34+-Zellen in Richtung Erythrozyten.

Bezeichnung	Konzentration
Humaner rekombinanter Stammzellfaktor (hSCF)	20 ng/ml
Humanes Interleukin-3 (IL-3)	5 ng/ml
Dexamethason	2 μ M
Estradiol	0,2 μ M
Erythropoetin (EPO)	1 U/ml

Für die Differenzierung in Richtung Megakaryozyten wurden die expandierten CD34+-Zellen mit dem SFEM II StemSpan-Medium mit verschiedenen Zusätzen für 5 Tage behandelt (siehe Tabelle 2. 19).

Tabelle 2. 19: Übersicht der verwendeten Zytokine und Chemikalien als Zusatz für die Differenzierung von CD34+-Zellen in Richtung der Thrombozyten.

Bezeichnung	Konzentration
Humaner rekombinanter Stammzellfaktor (hSCF)	10 ng/ml
Humanes Interleukin-6 (IL-6)	7,5 ng/ml
Humanes Interleukin-9 (IL-9)	13,5 ng/ml
Thrombopoetin (TPO)	30 ng/ml

Des Weiteren wurde ein Medium verwendet, welches die Differenzierung in die erythroide, als auch in die megakaryozytäre Richtung erlaubte. Dabei wurde das serumfreie SFEM II-Medium mit verschiedenen Zusätzen supplementiert (siehe Tabelle 2. 20).

Tabelle 2. 20: Übersicht der verwendeten Zytokine und Chemikalien als Zusatz für die Differenzierung von CD34+-Zellen zu Erythrozyten und Megakaryozyten-Vorläufer.

Bezeichnung	Konzentration
Humaner rekombinanter Stammzellfaktor (hSCF)	100 ng/ml
Humanes Interleukin-3 (IL-3)	10 ng/ml
Humanes Interleukin-6 (IL-6)	10 ng/ml
Thrombopoetin (TPO)	50 ng/ml
Erythropoetin (EPO)	0,5 U/ml oder 1 U/ml
L-Glutamin	2 mM

Die Differenzierung mit diesem Medium erfolgte abhängig von der Differenzierung etwa 10-12 Tage. Am fünften Tag der Differenzierung wurde eine Erhöhung der EPO-Konzentration auf 1 U/ml durchgeführt.

Während der verschiedenen Differenzierungen wurden die Zellen im Brutschrank bei einer Temperatur von 37°C und 5% CO₂ inkubiert.

2.4.4 Erstellung einer Wachstumskurve

Für die Erstellung einer Wachstumskurve wurden die K562-Zellen zunächst mit den *Knock-down*-Konstrukten transduziert (siehe Kapitel 2.4.7). Anschließend wurden die Zellen mit einer Konzentration von etwa $0,5 \times 10^6$ Zellen/ml ausgesät. Die Zellzahl wurde dann weitere sieben Tage bestimmt und somit das Zellwachstum in Abhängigkeit von der Zeit dargestellt.

2.4.5 Transfektion für die Herstellung lentiviraler Partikel

Für die Herstellung von Lentiviren wurden HEK293T/17-Zellen mit den entsprechenden Verpackungsplasmiden transfiziert. Speziell die HEK293T/17-Zellen sind dazu fähig nach einer Transfektion mit den gewünschten Plasmiden hohe Titer an Viruspartikeln zu produzieren (Pear *et al.*, 1993). Die Transfektion der Zellen erfolgte mit Polyethylenimin (PEI). Dafür wurden sie am Tag vor der Transfektion in große Kulturflaschen (175cm^2) mit einer Zelldichte von $1,2 \times 10^7$ Zellen ausgesät. Die Plasmid-DNA wurde zusammen mit PEI in einem 1,5 ml-Reaktionsgefäß in vorgelegtes serumfreies DMEM-Medium pipettiert, kurz gevortext und anschließend 20 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Nach der Inkubationszeit wird der Transfektionsansatz tropfenweise zu den Zellen gegeben (siehe Tabelle 2. 21).

Tabelle 2. 21: Übersicht der Mengenangaben für die Transfektion von HEK293T17-Zellen für die Virusproduktion. Es werden die benötigten Plasmide, sowie die Reagenzien aufgelistet.

Transfektionsreagenzien	Mengenangabe
pMD2.G (VSV-G)	10,7 µg
pCMV R8.91 (gag, pol, rev, tat)	23,4 µg
Transferplasmid	27,1 µg
PEI (Polyethylenimin)	150 µl
DMEM, serumfrei	Ad 500 µl

Da PEI eine toxische Wirkung hat wurde 4h nach der Transfektion ein Mediumwechsel durchgeführt. Nach 48 und 72 Stunden wurde das Kulturmedium, das die lentiviralen Partikel beinhaltet geerntet und bei 4°C bis zur weiteren Verabeitung gelagert.

2.4.6 Ultrazentrifugation lentiviraler Partikel

Durch eine Ultrazentrifugation konnte eine Aufkonzentrierung viraler Partikel, die im Kulturüberstand der HEK293T/17-Zellen vorhanden waren (siehe Kapitel 2.4.5), erreicht werden. Durch die Aufkonzentrierung der Virus-Partikel konnte eine erhebliche Steigerung der Transduktionseffizienz erreicht werden. Vor der Ultrazentrifugation wurde zunächst der gesammelte Virusüberstand 5 min bei 400 g herunterzentrifugiert, um diesen von vorhandenen Zellresten zu befreien. Anschließend wurde der Überstand mittels 22 µm-Filter steril filtriert und in ein Ultrazentrifugations-Röhrchen (#326823 BD Bioscience, Heidelberg) überführt. Dann erfolgte eine Unterschichtung des Überstands mit einer 20%igen Succrose-Lösung. Nun konnte die Ultrazentrifugation für 2 Stunden bei 25000 rpm und 4°C in der Zentrifuge BD L8-60M mit dem Rotoreinsatz SWi-Ti 32 stattfinden. Darauffolgend konnte der gesamte Überstand entfernt und das Virus-Pellet entweder in 500 µl 1xPBS für die Transduktion von Zelllinien oder in 500 µl SFEM StemSpan-Medium für die Transduktion von CD34+-Zellen resuspendiert werden. Der aufkonzentrierte Virus konnte entweder sofort verwendet oder bei -80°C gelagert werden.

20%ige Succrose-Lösung:
200 g D(+)-Saccharose in 1 l H₂O, steril

2.4.7 Transduktion von Zelllinien und primären Zellen

Für die Transduktion der K562-Zellen wurden zunächst $1,4 \times 10^6$ Zellen in 1,4 ml pro *well* einer 6-*well*-Platte ausgesät. Zu den Zellen wurden 100 µl des aufkonzentrierten Virus und 15 µl Protaminsulfat tropfenweise auf die Zellen gegeben. Die 6-*well*-Platte wurde anschließend bei 30°C und 2000rpm für 60 min zentrifugiert. Nach einer vierstündigen Inkubation der Zellen im Brutschrank wurden die Zellen mit zusätzlichen 2 ml Medium versorgt. An dem darauffolgenden Tag wurde 1 ml des Mediums entfernt und eine zweite Transduktion konnte nach der gleichen Methode erfolgen. Nach 48 Stunden wurden die Zellen herunter zentrifugiert und in neuem Medium resuspendiert. Anschließend konnte die Transduktionseffizienz mittels Durchflusszytometrie analysiert werden (siehe Kapitel 2.4.8).

Für die Transduktion der hämatopoetischen Stammzellen wurden jeweils 500 µl von 5×10^5 Zellen/ml in ein *well* einer 24-*well*-Platte ausgesät und 100 µl Virus, sowie 6 µl Protaminsulfat pro *well* hinzugegeben. Danach wurde wie oben beschrieben fortgefahren. Nach der zweiten Transduktion wurden die Zellen herunter zentrifugiert und in frisches Expansions- oder Differenzierungsmedium überführt.

Protaminsulfat:
400 g Protaminsulfat in 1 ml H₂O

2.4.8 Durchflusszytometrie

Eine durchflusszytometrische Analyse humaner Zellen wurde mittels FACS (*fluorescence activated cell sorting*) durchgeführt. Die Messung erfolgte mit dem FACS Canto II von BD Bioscience unter der Verwendung der FACSDiva Software (BD Bioscience, Heidelberg). Dabei konnte mit dieser Methode entweder die Transduktionseffizienz oder die Oberflächenexpression verschiedener Marker analysiert werden. Um die Expression verschiedener Oberflächen-Marker festzustellen, wurde zunächst eine Färbung mit Fluoreszenzgekoppelten Antikörper gegen verschiedene Oberflächenmoleküle durchgeführt. Für die Färbung wurden die Zellen einmal mit PBS gewaschen und anschließend mit 10 µl FcR-Blockierungsreagenz (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach) für 10 min inkubiert. Anschließend werden die Zellen erneut gewaschen und die Färbung mit dem jeweiligen Antikörper für 20 min im Dunkeln konnte erfolgen (siehe Tabelle 2. 22). Nach der Inkubation wurden die Zellen zweimal mit PBS gewaschen und in 500 µl PBS/BSA aufgenommen. Anschließend wurde die Messung mit dem FACS-Gerät durchgeführt.

Tabelle 2. 22: Übersicht der verwendeten FACS-Antikörper zur Oberflächen-Färbung.

Bezeichnung	Marker für	Firma
hCD41-APC	Megakaryozyten-Vorläufer	Biolegend (303710)
hCD41-Pacific Blue	Megakaryozyten-Vorläufer	Biolegend (303714)
hCD61-APC	Frühe megakaryozytäre Vorläufer	Miltenyi Biotec (130-098-578)
hCD235a-APC	Erythrozytäre Vorläufer	Biolegend (349107)
hCD235a-PE	Erythrozytäre Vorläufer	BD Bioscience (561051)
hCD71-PE	Frühe erythrozytäre Vorläufer	Biolegend (334106)
hCD71-APC	Frühe erythrozytäre Vorläufer	Miltenyi Biotec (130-091-721)
hCD34-FITC	Unreife, hämatopoetische Stammzellen	Biolegend (343503)

2.4.9 Colony forming unit -Assay

Mit Hilfe des *Colony forming unit*- Assays (CFU-Assay) wurde die Differenzierung, als auch die Kolonienanzahl von humanen CD34+-Zellen bestimmt. Dafür wurden die Zellen zunächst nach dreitägiger Expansion entweder transduziert oder mit einem Inhibitor behandelt, um die

Auswirkungen dieser Behandlungen auf die Differenzierung zu untersuchen. Nach der Transduktion wurden die Zellen nochmals zwei Tage expandiert und anschließend in das Methylcellulose-Medium (StemMACS HSC-CFU mit Epo, human) überführt. Die CD34⁺-Zellen, die mit Inhibitor behandelt wurden, sind direkt mit der spezifischen Konzentration in dem Methylcellulose-Medium ausgesät worden. Dabei wurden 1×10^4 Zellen in 3 ml Methylcellulose-Medium resuspendiert und nach starkem Mischen mittels Vortexer je 1,4 ml in 35 mm große Kulturschalen ausplattiert. Die spezielle Zytokin-Zusammensetzung ermöglicht den humanen CD34⁺-Zellen zu proliferieren und in verschiedene Kolonien zu differenzieren. Dabei können die Zellen in Granulozyten-, Monozyten-, Erythrozyten- und Mischkolonien differenzieren. Die Viskosität der Methylcellulose ermöglicht die Ausbildung von einzelnen Kolonien, da die Zellen sich im Medium nicht verteilen können. Die Analyse der ausgesäten Methylcellulose-Schalen erfolgte mikroskopisch nach etwa 10-12 Tagen.

2.5 Methoden für das Arbeiten im murinen System

2.5.1 *Xenograft*-Experiment

Das *Xenograft*-Experiment wurde in Zusammenarbeit mit Josephine Wesely aus der Arbeitsgruppe Zörnig aus dem Georg-Speyer-Haus durchgeführt. Dafür wurden zunächst K562-Zellen, so wie unter 2.4.7 beschrieben transduziert und die GFP-positiven Zellen mittels FACS sortiert (siehe 2.4.8). Es wurde ein Kontroll-Konstrukt, und zwei Konstrukte die eine shRNA gegen PRMT6 beinhalten, verwendet. Nach der Sortierung erfolgte eine Kultivierung und Expansion der transduzierten Zellen für 5 Tage. Anschließend wurden die Zellen gezählt, zweimal mit PBS gewaschen und zehn Millionen Zellen in einer Matrigel-Mischung von 1:1 pro Maus (Mausstamm: C57BL/6) in die Flanke injiziert. Die Injektion erfolgte dabei subkutan. Die Stichprobenanzahl der Mäuse pro Konstrukt betrug sieben. Über einen Zeitraum von 24 Tagen wurde in regelmäßigen Zeitabständen die Tumorgroße bestimmt. Nach Beendigung des Versuchs wurden die Mäuse durch zervikale Dislokation getötet und die entstandenen Tumore entnommen. Diese wurden mikroskopisch auf GFP-Expression untersucht.

2.5.2 Separation von Progenitorzellen aus dem Knochenmark

Die Separation von murinen Progenitorzellen aus dem Knochenmark erfolgte mit Hilfe des *Lineage Cell depletion Kit (mouse)* von Miltenyi Biotec. Zuvor wurden die Mäuse (Mausstamm: C57BL/6) durch zervikale Dislokation getötet und Tibia und Femur entnommen. Diese wurden von Muskelresten befreit und die Knochenmarkszellen mit Hilfe einer Spritze mit PBS aus den Knochen ausgespült. Die gewonnenen Zellen wurden zweimal mit PBS gewaschen und die Progenitorzellen mit Hilfe des *lineage depletion Kits* (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach) nach Herstellerangaben isoliert. Das Kit beruht auf einer Depletion der differenzierten murinen Zellen, die durch negative Selektion mittels magnetischer *beads* von den Progenitorzellen separiert werden.

2.5.3 Colony forming unit- Assay von linien-depletierten Zellen

Für das CFU-Assay von linien-depletierten Zellen wurde zunächst eine Aufreinigung von Progenitorzellen aus dem Knochenmark von Mäusen (Mausstamm: C57BL/6), wie unter 2.5.2 beschrieben durchgeführt. Bevor die Zellen in Methylcellulose-Medium ausgesät wurden, wurden sie wie unter Kapitel 2.4.7 beschrieben transduziert. In diesem Versuch wurden die Zellen mit einem Kontroll-Konstrukt und einem Überexpressionskonstrukt von PRMT6 transduziert. Um die Zellen in Kultur zu nehmen, wurden sie in SFEM StemSpan serumfreiem Medium (Stemcell Technologies, Vancouver) mit einem bestimmten Zytokin-Cocktail, der sich auch STIF-Cocktail (Zhang und Lodish 2005) nennt, für zwei Tage kultiviert (siehe Tabelle 2. 23).

Tabelle 2. 23: Übersicht der verwendeten Zytokine für die Kultivierung von Linien-depletierten murinen Progenitorzellen.

Bezeichnung	Konzentration
Muriner Stammzellfaktor (SCF)	10 ng/ml
Murines Thrombopoetin (TPO)	20 ng/ml
<i>Murine Insulin-like growth factor-2 (IGF-2)</i>	20 ng/ml
<i>Murine Fibroblast growth factor-1 (FGF-1)</i>	10 ng/ml

Während der Transduktion wurden die Zellen nochmal zwei Tage kultiviert und konnten anschließend für das CFU-Assay ausgesät werden. Dabei wurden die Zellen zunächst mit PBS gewaschen, um sie von den restlichen Zytokinen zu befreien und wurden wie unter 2.4.9

nach der gleichen Prozedur behandelt. Hierbei wurden die Zellen jedoch in einem anderen Methylcellulose Medium, MethoCult GF M3434 für murine Zellen (StemCell Technologies, Vancouver), ausgesät. Nach sieben bis etwa acht Tagen erfolgte die mikroskopische Analyse der Kolonien. Dabei wurden in diesem Fall nur die GFP-positiven Kolonien ausgezählt. Ebenso konnten zusätzlich zu den Kolonien, die in dem humanen Assay ausgezählt werden können, auch Megakaryozyten-Kolonien unterschieden werden.

2.6 Auswertung

Alle Daten werden als Mittelwert (MW) mit Standardabweichung (SD; *standard deviation*) angegeben. Alle gezeigten Daten wurden mit dem Programm GraphPad Prism 6 verbildlicht und analysiert, mit Ausnahme der FACS-Experimente. Für die Auswertung der FACS-Experimente wurde die BD FACSDIVA Software von BD Bioscience benutzt. Für die bioinformatische Promotoranalysen wurde der UCSC *Genome Browser* (GRCh37/hg19) verwendet (siehe Tabelle 2. 24).

Tabelle 2. 24: Auflistung der Internet-Links zur UCSC-website für die Promotoranalyse. Für die bioinformatische Promotoranalyse und der Analyse der potentiellen Bindestellen von Transkriptionsfaktoren wurden die Daten des UCSC Genome Browser (GRCh37/hg19) genutzt.

Promotorregion	Link zur UCSC-website
BCL6	https://genome.ucsc.edu/cgi-bin/hgTracks?db=hg38&lastVirtModeType=default&lastVirtModeExtraState=&virtModeType=default&virtMode=0&nonVirtPosition=&position=chr3%3A187706157%2D187760947&hgid=667652723_1NDIwd3pqEA6G8mG7I5BBRo2w0Z
CD41 (ITGA2B)	https://genome.ucsc.edu/cgi-bin/hgTracks?db=hg38&lastVirtModeType=default&lastVirtModeExtraState=&virtModeType=default&virtMode=0&nonVirtPosition=&position=chr17%3A44383390%2D44386740&hgid=667652723_1NDIwd3pqEA6G8mG7I5BBRo2w0Z
CDKN1B	http://genome.ucsc.edu/cgi-bin/hgTracks?db=hg19&lastVirtModeType=default&lastVirtModeExtraState=&virtModeType=default&virtMode=0&nonVirtPosition=&position=chr12%3A12867175%2D12878433&hgid=662850813_M9RZmDocVZ98UpfsIncNcEhh4x5V
GAPDH	https://genome.ucsc.edu/cgi-bin/hgTracks?db=hg38&lastVirtModeType=default&lastVirtModeExtraState=&virtModeType=default&virtMode=0&nonVirtPosition=&position=chr12%3A6532815%2D6539482&hgid=667652723_1NDIwd3pqEA6G8mG7I5BBRo2w0Z

<i>GYP A</i>	http://genome.ucsc.edu/cgi-bin/hgTracks?db=hg19&lastVirtModeType=default&lastVirtModeExtraState=&virtModeType=default&virtMode=0&nonVirtPosition=&position=chr4%3A145022593%2D145069766&hgsid=662850813_M9RZmDocVZ98UpfslncNcEhh4x5V
<i>TSP1</i>	https://genome.ucsc.edu/cgi-bin/hgTracks?db=hg38&lastVirtModeType=default&lastVirtModeExtraState=&virtModeType=default&virtMode=0&nonVirtPosition=&position=chr15%3A39574283%2D39601843&hgsid=667652723_1NDlwd3pqEA6G8mG7l5BBR02w0Z

3 Ergebnisse

3.1 PRMT6 beeinflusst das Zellwachstum

PRMT6 ist ein wichtiger epigenetischer Faktor, der die reprimierende Histonmodifikation H3R2-Dimethylierung an seinen Zielgenen etabliert und somit die Transkription beeinflussen kann. Es wurde von Phalke *et al* (2012) beschrieben, dass PRMT6 als ein transkriptioneller Kofaktor agiert, der direkt den p21-Promotor reprimiert. Das bedeutet, dass ein PRMT6-*Knockdown* in einer Aufhebung der Repression von p21 in Brustkrebszelllinien resultiert. Dadurch kommt es zu einem Zellzyklus-Arrest und zur zellulären Seneszenz. Bis jetzt ist nur ein Zusammenhang von PRMT6 mit einem verringerten Zellwachstum in Brustkrebszelllinien bekannt. Im Kontext mit einer Leukämie-Zelllinie oder generell für das hämatopoetische System ist jedoch noch nichts beschrieben worden.

Um herauszufinden, ob PRMT6 auch einen reprimierenden Effekt auf das Wachstum einer Leukämie-Zelllinie hat, wurden K562 mit einem *Knockdown*-Konstrukt von PRMT6 und einem Kontroll-Konstrukt transduziert und das Zellwachstum der Zelllinie in Zellkultur gemessen. Dabei wurde die Zellzahl an verschiedenen Tagen bestimmt, um eine Wachstumskurve darzustellen.

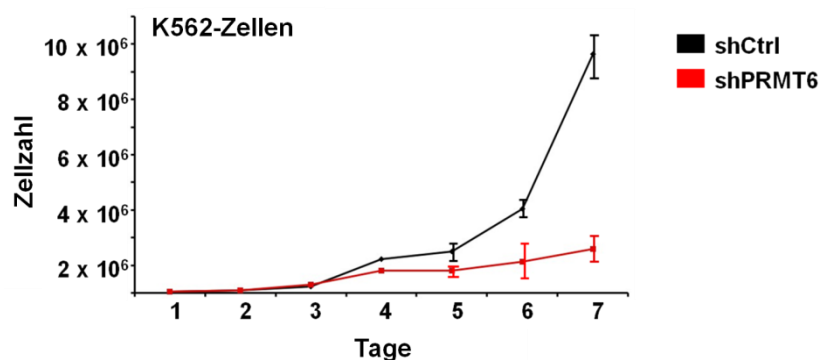


Abbildung 3. 1: Wachstumskurve nach PRMT6 *Knockdown*. K562 Zellen wurden mit jeweils einer Kontroll-shRNA und einer shRNA gegen PRMT6 transduziert. Anschließend wurden die Zellzahlen nach verschiedenen Tagen nach der Transduktion bestimmt während die Zellen weiterhin für sieben Tage in Kultur gehalten wurden.

In Abbildung 3. 1 wird ersichtlich, dass die *Knockdown*-Zellen viel langsamer wachsen, als die Kontrollzellen. Nach Tag sieben ist ein deutlicher Unterschied der Zellzahlen für die Kontrollzellen bei 10×10^6 und für die *Knockdown*-Zellen bei $2,5 \times 10^6$ zu verzeichnen. Das be-

deutet, dass der *Knockdown* von PRMT6 einen inhibierenden Effekt auf das Zellwachstum der Erythroleukämie-Zelllinie K562 hat.

Infolgedessen wurde untersucht, ob dieser Effekt in der Zelllinie auch in einem *Xenograft*-Experiment *in vivo* zu beobachten ist. Dafür wurden K562-Zellen mit zwei verschiedenen *Knockdown*-Konstrukten für PRMT6 und einem Kontroll-Konstrukt transduziert (siehe Vektoren Kapitel 2.3.1), die GFP-positiven Zellen mittels FACS sortiert und nachfolgend zehn Millionen Zellen in einer Matrigel-Mischung von 1:1 in Mäuse injiziert. Bevor das Experiment mit den Mäusen begonnen wurde, wurde durch ein Western Blot der *Knockdown* von PRMT6 auf Protein-Ebene überprüft (siehe Abbildung 3. 2 A). Die transduzierten Zellen wurden nach der Überprüfung den Mäusen subkutan in die Flanken gespritzt und die Tumorgöße nach verschiedenen Zeitpunkten gemessen (siehe Kapitel 2.5.1).

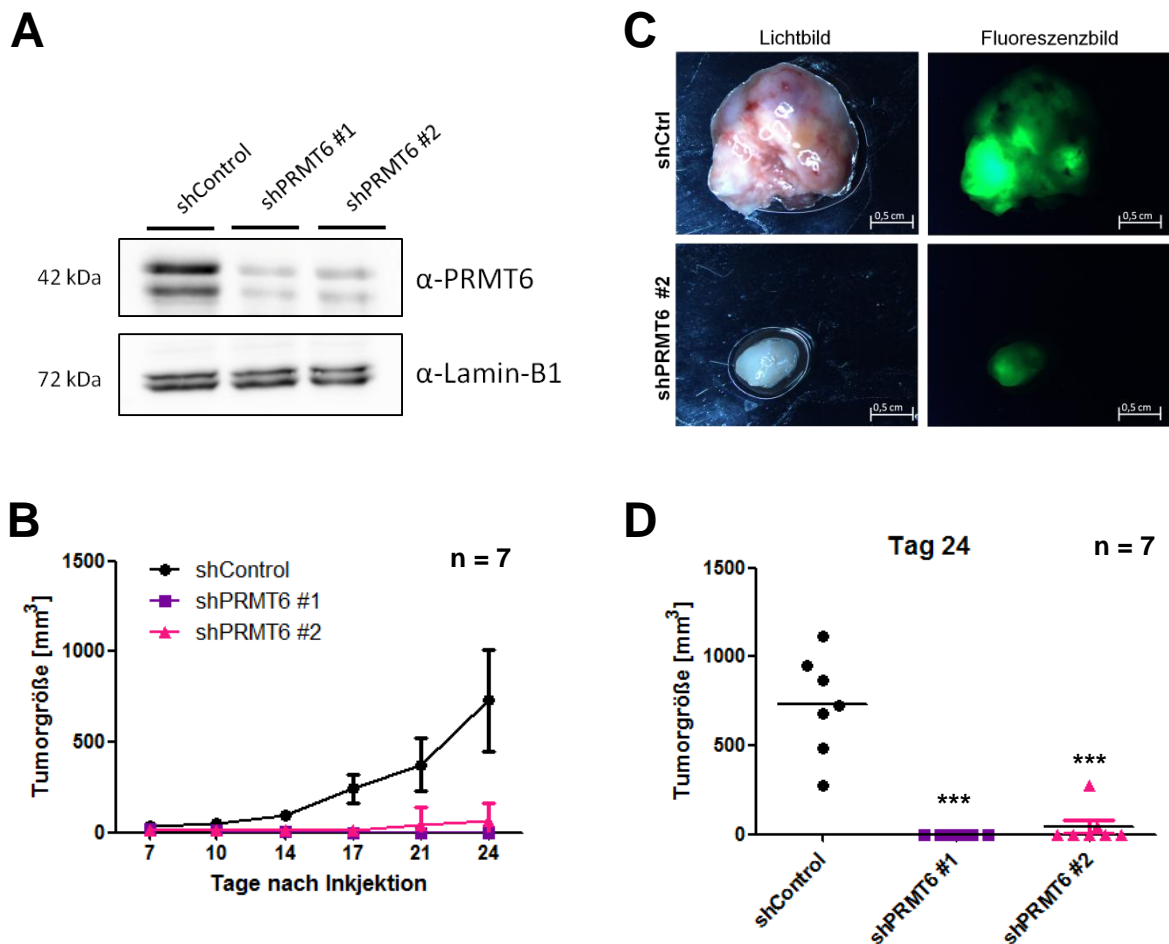


Abbildung 3. 2: Analyse des Tumorwachstum mit Hilfe eines *Xenograft*-Experiments mit shPRMT6 *Knockdown*-Konstrukten. K562-Zellen wurden mit einer Kontroll-shRNA und zwei verschiedenen shRNAs gegen PRMT6 transduziert, mittels FACS sortiert und die Zellen anschließend subkutan in die Flanken der Mäuse gespritzt. Dabei wurden 10 Millionen Zellen in einer 1:1 Matrigel-Mischung pro Maus injiziert. (A) Der *Knockdown* wurde zuvor mittels Western Blot überprüft. Es wurden Gesamtzellextrakte hergestellt und mit einem Primärantikörper gegen PRMT6 der *Knockdown* bestätigt. Als Ladekontrolle wurde Lamin B1 verwendet. (B) Die wachsenden Tumore wurden in regelmäßigen Zeitabständen gemessen und das Tumolvolumen in Abhängigkeit der Zeit dargestellt. In (C) wird exemplarisch jeweils ein extrahierter Tumor für die Kontrollzellen, sowie für die *Knockdown*-Zellen gezeigt. Die Extraktion der Tumore wurde an Tag 24 durchgeführt, was den Endstatus darstellt. Nach der Extraktion der Tumore wurde ebenfalls die GFP-Expression mit einem Fluoreszenz-Mikroskop überprüft. Das GFP-Gen, liegt auf dem gleichen shRNA-Vektor und diente somit der Überprüfung der Expression der shRNAs auch nach der Tumorentwicklung. (D) Der Endstatus der Tumorgößen wird an Tag 24 dargestellt. Die Kontrollzellen entwickeln Tumore, die *Knockdown*-Zellen hingegen entwickeln keine (shPRMT6 #1) oder nur kleine Tumore (shPRMT6 #2) nach 24 Tagen. Die P-Werte wurden mit einer OneWay Anova kalkuliert. ***P < 0,001.

Dieses Experiment wurde in Zusammenarbeit mit Josephine Wesely aus der Arbeitsgruppe Zörnig durchgeführt.

Mit dem *Xenograft*-Experiment konnte gezeigt werden, dass der PRMT6-*Knockdown* auch *in vivo* einen Effekt auf das Wachstum des Tumors hat. Bei den Messungen der Tumorgöße über die Zeit wird ersichtlich, dass der Unterschied der Tumorgößen zwischen dem *Knockdown* und der Kontrolle mit zunehmender Zeit immer deutlicher wird (Abbildung 3. 2 B). Die Abbildung 3. 2 D des Endpunkt-Status an Tag 24 zeigt diesen Unterschied ebenfalls. Für shPRMT6 #1 ist nach 24 Tagen gar kein Tumor mehr zu messen, während für das andere sh-Konstrukt nur sehr kleine Tumore zu verzeichnen sind. Die Kontrollzellen entwickeln Tumore, die in ihrer Größe von 278 mm³ bis 1115 mm³ variieren, während die shPRMT6#1-Zellen keine Tumore entwickeln. Die shPRMT6#2-Zellen entwickeln auch keine oder nur kleine Tumore, die in Ihrer Größe von 0 bis 271 mm³ variieren. Einer der Tumore, der sich mit dem shPRMT6 #2-Konstrukt gebildet hat, wird exemplarisch in Abb. 3. 2 C bildlich dargestellt. Außerdem wird ein Tumor, der sich mit den Kontrollzellen gebildet hat, exemplarisch in Abb. 3. 2 C gezeigt und die Tumore auf ihre GFP-Expression untersucht. Die GFP-Expression diente der Überprüfung der Expression der sh-RNAs, da das GFP ebenfalls mit den shRNAs exprimiert wird (siehe Vektoren 2.3.1).

Um herauszufinden ob PRMT6 auch einen Einfluss auf das Zellwachstum von primären Zellen hat, wurde ein *colony forming unit*-Assay mit CD34+-Zellen durchgeführt. Dabei werden CD34+-Zellen mit *Knockdown* oder Überexpressionsvektoren lentiviral transduziert und die Zellen nach zweitägiger Kultivierung in Methylcellulose ausplattiert. Nach etwa 10-14 Tagen können die Kolonien gezählt werden (siehe Kapitel 2.4.3 und 2.4.9).

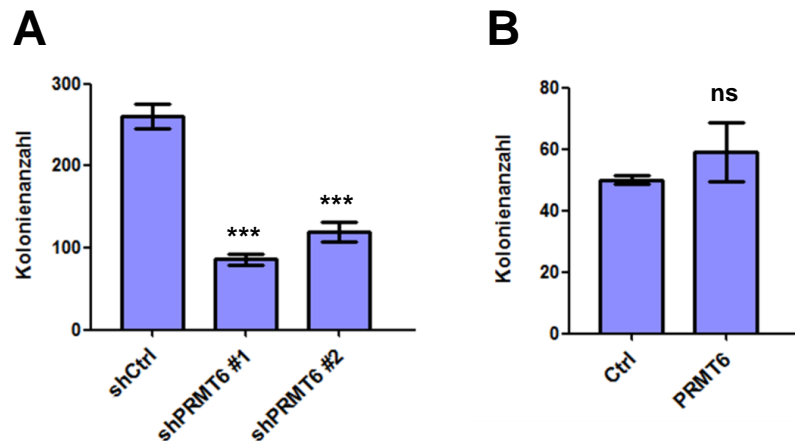


Abbildung 3. 3: Colony forming unit-Assay mit primären CD34+-Zellen. Es wurden humane CD34+-Progenitorzellen vier Tage in Zellkultur expandiert und anschließend mit einem Kontroll- und einem *Knockdown*- (A) oder Überexpressionsvektor (B) transduziert. GFP-positive Zellen wurden mittels FACS isoliert und in Methylcellulose ausplattiert. Nach 10-14 Tagen im Inkubator wurden die Kolonienanzahlen bestimmt. Die P-Werte wurden mit Student's t-Test kalkuliert. ***P < 0,001; ns = nicht signifikant.

In Abbildung 3. 3 kann man erkennen, dass der *Knockdown* von PRMT6 einen Einfluss auf die Kolonienanzahlen der CD34+-Zellen hat. Wenn PRMT6 mit zwei verschiedenen *Knockdown*-Konstrukten herunterreguliert wird, sind weniger Kolonien im Vergleich zu der Kontrolle zu verzeichnen. Wenn jedoch PRMT6 durch lentivirale Transduktion in den CD34+-Zellen überexprimiert wird, kann man keinen Unterschied mehr im Vergleich zu den Kontrollzellen feststellen. Daraus kann man schließen, dass der *Knockdown* von PRMT6 eine Wirkung auf das Zellwachstum primärer Zellen hat, während eine Überexpression keine Veränderung zeigt.

3.2 PRMT6 ist in AML-Patienten-Proben exprimiert

PRMT6 ist ein wichtiger epigenetischer Faktor, der zusätzlich dafür bekannt ist in vielen soliden Tumorentitäten überexprimiert zu sein (Yoshimatsu et al, 2011). Es konnte gezeigt werden, dass PRMT6 in Brust-, Blasen-, Prostata-, Lungenkrebs und in Lymphomen hochreguliert ist. Obwohl durch cDNA-*microarrays* beobachtet wurde, dass 40% der Lymphoma-Patienten PRMT6 überexprimieren (Yoshimatsu et al, 2011), wurde bis jetzt noch nicht gezeigt, dass PRMT6 auch in anderen hämatologischen Krankheiten verstärkt exprimiert ist (Greenblatt et al, 2016). Aus diesem Grund sollte der Expressionsstatus von PRMT6 in AML-Patienten-Proben überprüft werden.

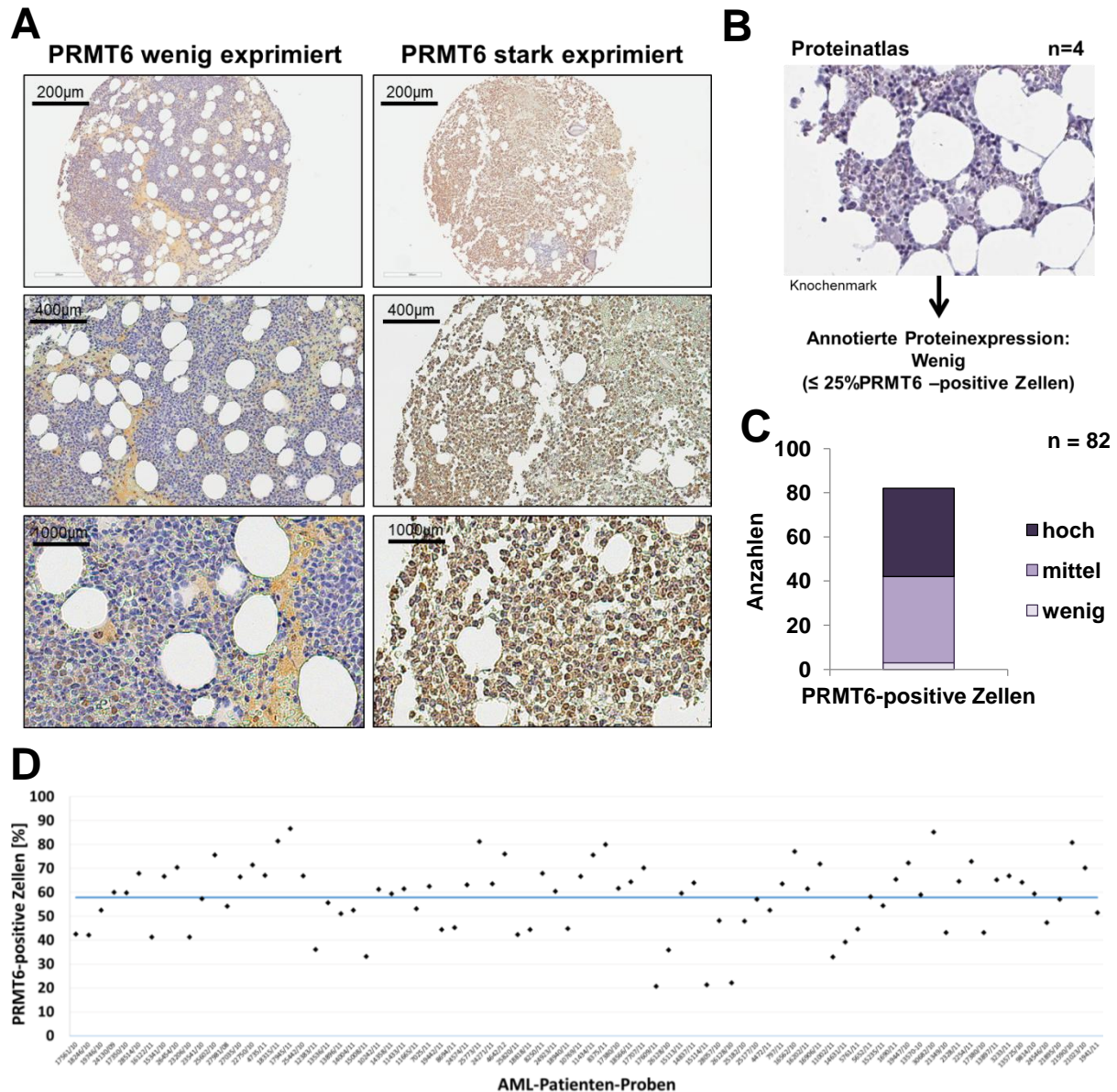


Abbildung 3. 4: Darstellung der Expression von PRMT6 in *tissue-microarray*-Proben von AML-Patienten. Die Knochenmarkstanzen der AML-Patienten wurden bei dem *tissue-microarray* als einzelne Spots auf einem Objektträger fixiert, mit einem PRMT6-Antikörper (sc-365018, Santa Cruz) inkubiert und nachfolgend mit einem Peroxidase-gekoppelten anti-Maus-Antikörper, die Braunfärbung der PRMT6-positiven Zellen sichtbar gemacht. Danach erfolgte eine mikroskopische Auswertung. In (A) sind beispielhaft Färbungen von zwei verschiedenen AML-Patienten bildlich in verschiedenen Vergrößerungen dargestellt. Dabei ist PRMT6 in einer Probe wenig exprimiert und in der anderen Probe stark exprimiert. (B) Proben von gesunden Patienten exprimieren PRMT6 im Vergleich eher wenig ($\leq 25\%$ PRMT6 positive Zellen). Es wird eine Färbung bildlich dargestellt. Diese Daten stammen von der Website Proteinatlas, in der Knochenmark-Proben von vier Patienten mit wenig PRMT6-Expression dargestellt sind. (C) Nach Auswertung der *tissue-microarray* Daten wurden die Prozentzahlen der PRMT6-positiven Zellen in drei Kategorien eingeteilt (wenig: $\leq 30\%$, mittel: $30-60\%$, hoch: $>60\%$) und ein Balkendiagramm erstellt. (D) Graphische Darstellung der PRMT6-positiven Zellen in % von allen AML-Patienten, sodass die Verteilung der Proben sichtbar wird. Die durchschnittliche Expression wird mit einer blauen Linie dargestellt.

Dieses Experiment wurde in Kooperation mit Stefanie Göllner, die in der Arbeitsgruppe von Carsten Müller-Tidow in Halle arbeitet, durchgeführt.

Hierzu wurde ein *tissue-microarray* von Knochenmarksproben ausgewertet, in dem Proben von AML-Patienten mit einem PRMT6-Antikörper gefärbt wurden. PRMT6-positive Zellen

stellen sich durch eine Braunfärbung dar, die durch eine Immun-Peroxidase-Reaktion zustande kommt. Es wurden 82 AML-Patienten-Proben untersucht, die PRMT6-positiven Zellen in jeder Knochenmark-Stanze analysiert und diese Zahl prozentual dargestellt. In Abbildung 3. 4 A sind exemplarisch Bilder der Knochenmarkstanzen von AML-Patienten dargestellt, bei denen PRMT6 stark exprimiert und bei denen PRMT6 wenig exprimiert wird. Dabei kann man erkennen, dass die Braunfärbung der Zellen gut von den PRMT6-negativen Zellen, die sich als Blaufärbung darstellt zu unterscheiden sind. In Abbildung 3. 4 B ist exemplarisch eine PRMT6-Färbung eines Knochenmarks zu erkennen, die aus der Datenbank Proteinatlas entnommen wurde (Uhlen et al, 2005). Diese Knochenmarkfärbungen stammen von gesunden Spendern und zeigen im Vergleich zu den AML-Patienten-Proben wenig PRMT6-Expression ($\leq 25\%$). Abbildung 3. 4 C verdeutlicht dies noch einmal, in der die Proben in drei Kategorien eingeteilt wurden: wenig, mittel und hoch. Nur drei AML-Patienten von 82 hatten eine PRMT6-Expression, die mit wenig bewertet wurde. Die meisten Patienten zeigen eine mittlere (30-60%) bis starke ($>60\%$) Expression von PRMT6. Dies wird noch einmal in Abbildung 3. 4 D deutlich, welche die prozentualen Anteile der PRMT6-positiven Zellen von allen Patienten zeigt. Im Durchschnitt lag die PRMT6-Expression aller Patienten bei etwa 60% positiver Zellen, was die blaue Linie anzeigt. Folglich kann festgestellt werden, dass PRMT6 in AML-Patienten stark exprimiert wird, während Material von gesunden Spendern nur eine schwache PRMT6-Expression aufzeigt.

Weiterhin wurde analysiert, ob die PRMT6-Expression mit dem Geschlecht der Patienten oder dem FAB-Subtyp der AML korreliert. Bei diesen Analysen lag eine geringere Stichprobenanzahl vor, da nicht von allen Patienten das Geschlecht oder FAB-Subtyp ermittelt wurde.

Ein geschlechtsspezifischer Unterschied in der PRMT6 Expression scheint vorhanden zu sein, da die männlichen AML-Patienten signifikant mehr PRMT6-Expression zeigen als die weiblichen Patienten (Abbildung 3. 5). Jedoch ist zu bemerken, dass dieser geschlechtsspezifische Unterschied mit einem p-Wert von 0.04, sich an der Signifikanzgrenze befindet. Eine AML kann mit Hilfe der FAB-Klassifikation in bestimmte Subtypen eingeordnet werden, die sich in ihrer Morphologie mikroskopisch unterscheiden lassen und oft auf einem bestimmten Zelltyp basieren (siehe Tabelle 1.1). Bei den unterschiedlichen Subtypen scheint keine Korrelation zu bestehen, da sich die Gruppen untereinander nicht signifikant unterscheiden. Es kann jedoch ein Trend festgestellt werden. Der Fab-Typ M5 weist die höchste PRMT6-Expression im Mittel auf, während der Subtyp M6 die niedrigste PRMT6-Expression im Vergleich zu den anderen Subtypen aufzeigt. Der Fab-Subtyp M5 ist mit einer monozytären Leukämie und der Subtyp M6 mit einer Erythroleukämie assoziiert. Zusätzlich muss jedoch bemerkt werden, dass in dieser Gruppe die Stichprobenanzahl bei nur vier Proben lag ($n=4$).

Um einen signifikanten Unterschied feststellen zu können, wären für diese Gruppe mehr Stichproben nötig gewesen.

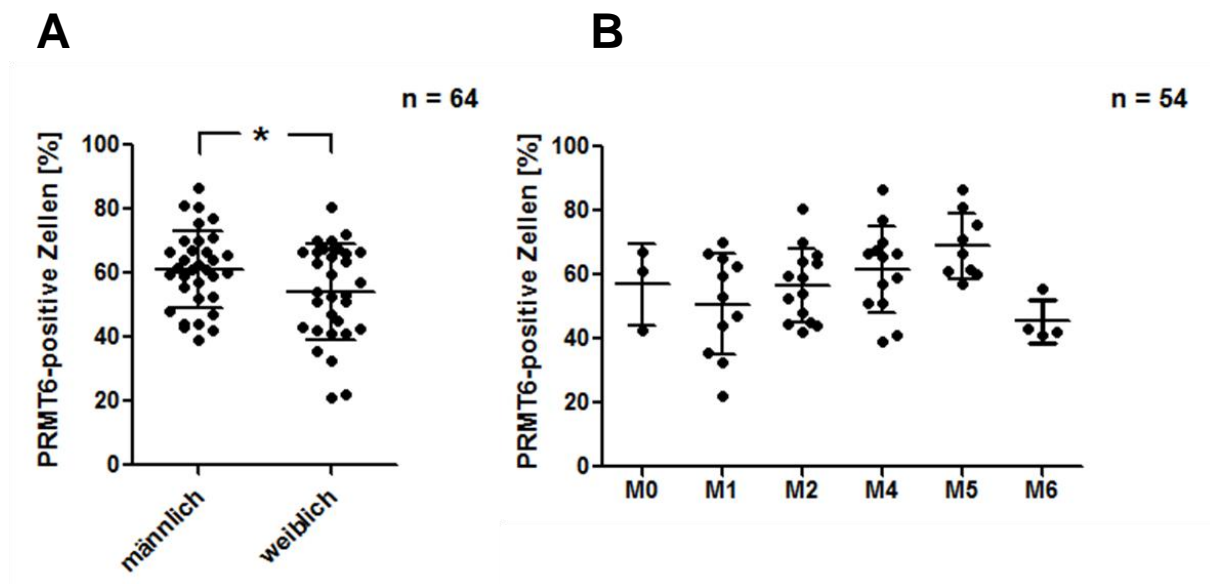


Abbildung 3. 5: Korrelation der PRMT6-Expression mit dem Geschlecht und dem FAB-Subtyp der AML-Patienten. Die Knochenmarkstanzen von AML-Patienten wurden bei dem *tissue-microarray* als einzelne Spots auf einem Objektträger fixiert, mit einem PRMT6-Antikörper (sc-365018, Santa Cruz) inkubiert und nachfolgend mit einem Peroxidase-gekoppelten anti-Maus-Antikörper, die Braunfärbung der PRMT6-positiven Zellen sichtbar gemacht und die PRMT6-Positivität jeder Probe mikroskopisch bestimmt. Die Ergebnisse zeigen die prozentualen Anteile der PRMT6-positiven Zellen der AML-Proben in Korrelation zum Geschlecht (A) oder zum FAB-Subtyp (B). Die PRMT6-positiven Zellen wurden von den *tissue-microarray* Proben analysiert und ausgewertet.

Letztlich kann vermutet werden, dass PRMT6 eine Rolle in der AML-Entstehung haben könnte, da PRMT6 im Vergleich zu den gesunden Spendern, in den AML-Proben überexprimiert zu sein scheint. Es kann jedoch nicht von einem geschlechtsspezifischen Unterschied oder von einer Korrelation des FAB-Subtyps mit der Stärke der PRMT6-Expression ausgegangen werden.

3.3 PRMT6 beeinflusst Gene, die das Zellwachstum regulieren

Da PRMT6 in AML-Patienten exprimiert zu sein scheint und PRMT6 vermutlich eine Rolle in der AML-Entwicklung inne hat, sollten potentielle Zielgene von PRMT6 ermittelt werden. PRMT6 ist ein enzymatischer Kofaktor, der nur durch Transkriptionsfaktoren an DNA rekrutiert werden kann. Einer der potentiell beteiligten Transkriptionsfaktoren könnte RUNX1 sein.

RUNX1 ist ein wichtiger Transkriptionsfaktor in der AML-Progression und der Hämatopoese und kann PRMT6 an seine Zielgene rekrutieren (Herglotz et al. 2011). Folglich sollten zunächst gemeinsame Zielgene von RUNX1 und PRMT6 mittels Expressions-Array identifiziert werden.

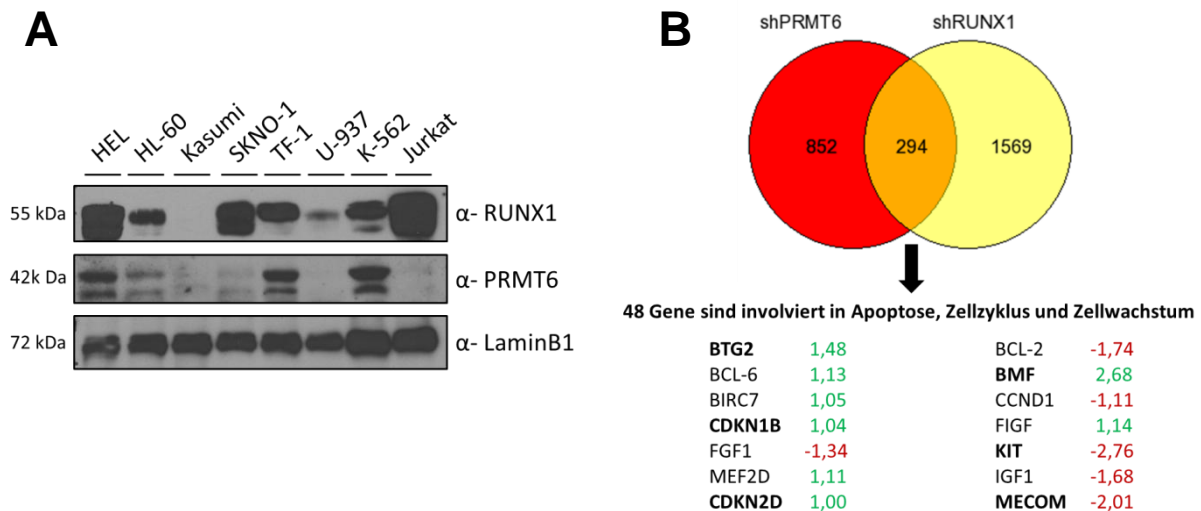


Abbildung 3. 6: Western Blot und Microarray-Expressionsanalyse. (A) Western Blot von verschiedenen Leukämie-Zelllinien. Es wurde von allen Zelllinien (HEL, HL-60, Kasumi, SKNO-1, TF-1, U-937, K562, Jurkat) Gesamtzelllysate hergestellt, die Proteine mittels SDS-PAGE aufgetrennt und *per semi dry*-Blot auf Membranen übertragen. Die Membranen wurden mit verschiedenen Primärantikörpern, die gegen RUNX1, PRMT6 und Lamin B1 gerichtet waren, inkubiert. Lamin-B1 diente dabei als Ladekontrolle. (B) Ein Venn-Diagramm aller Gene, die von der Herunterregulation von PRMT6 und RUNX1 beeinflusst sind, wird dargestellt. Dafür wurden K562-Zellen zunächst mit shRNAs gegen PRMT6, RUNX1 oder einer Kontroll-shRNA transduziert und eine *Microarray*-Expressionsanalyse durchgeführt. Von allen veränderten Genen sind 294 Gene gemeinsam in beiden Datensätzen durch den *Knockdown* beeinflusst. Für 48 dieser gemeinsam veränderten Gene, wurde eine Beteiligung in der Apoptose, dem Zellzyklus und dem Zellwachstum beschrieben. Einige dieser Gene, die in diesen Prozessen hoch- oder herunterreguliert sind, werden gezeigt. Die Zahlen drücken dabei die Veränderung durch *Knockdown* von PRMT6 im Vergleich zur Kontrolle, die eine Kontroll-shRNA exprimiert, als \log_{fold}^2 aus. Grüne Zahlen stehen für eine Hochregulation und rote Zahlen für eine Herunterregulation im Vergleich zur Kontrolle. Gene die in fett dargestellt sind, wurden nachfolgend verifiziert.

Zunächst wurde in einem Western Blot überprüft, ob RUNX1 und PRMT6 in verschiedenen Leukämie-Zelllinien koexprimiert werden (Abbildung 3. 6 A). Eine Koexpression kann auf eine mögliche funktionelle Beziehung zweier Proteine hinweisen. Es konnte festgestellt werden, dass beide Proteine in den Zelllinien HEL, TF-1 und K562 stark exprimiert werden. Diese Zelllinien stellen Erythroleukämie-Zelllinien dar, die in die erythroide oder megakaryozytäre Richtung differenziert werden können. Nachfolgend wurden alle weiteren Experimente mit der Zelllinie K562 durchgeführt, da diese Zelllinie eine hämatopoetische Zelllinie darstellt und PRMT6, sowie RUNX1 in dieser Zelllinie exprimiert werden.

Für die Expressionsanalyse wurde jeweils ein *Knockdown* von PRMT6 oder ein *Knockdown* von RUNX1 in der Erythroleukämie-Zelllinie K562 etabliert. Die Genexpressionsanalyse wur-

de fünf Tage nach der Transduktion mit dem shPRMT6 oder shRUNX1 Expressionsvektor durchgeführt. Der PRMT6-*Knockdown* resultierte in einer Veränderung der Expression in mehr als 1000 Genen, während der RUNX1-*Knockdown* eine Veränderung von etwa 1800 Genen zeigte (siehe Abbildung 3. 6 B). In der Liste inbegriffen sind Gene, die mindestens eine zweifache Veränderung ($\log_2 \geq 1$) aufweisen. 294 Gene sind gemeinsam in beiden Datensätzen durch den RUNX1-*Knockdown* und den PRMT6-*Knockdown* verändert. Von diesen gemeinsam beeinflussten Genen sind 48 Gene in Prozesse, wie Apoptose, Zellzyklus und Zellwachstum involviert. Unter diesen Genen sind Zellzyklusregulatoren zu finden, wie *CDKN1B* (*Cyclin-dependent kinase inhibitor 1B*), *CDKN2D* (*Cyclin-dependent kinase inhibitor 2D*) und *BTG2* (*B-cell translocation gene 2*), die den Zellzyklus arretieren können (Farioli-Vecchioli et al, 2007; Guardavaccaro et al, 2000; Montagnoli et al, 1996; Schreiber et al, 1999). *BMF* (*Bcl-2-modifying factor*) agiert als apoptotischer Aktivator (Chen et al, 2005; Lei & Davis, 2003; Zhang et al, 2006), während *cKIT* (*proto-oncogene receptor tyrosine kinase*) in der Proliferation und der Differenzierung von hämatopoetischen Stammzellen involviert ist (Brandt et al, 1992). Für MECOM (oder EVI1) konnte gezeigt werden, dass es den Cyclin-abhängigen Kinaseinhibitor p21 (*CDKN1A*) reguliert und dadurch die Zellzyklus-Progression und Zellproliferation in Darmkrebs verzögert (Nayak et al, 2013). Die Veränderung der Expression dieser Gene wurde nachfolgend nach *Knockdown* von PRMT6 in K562-Zellen mittels quantitativer *real-time* PCR verifiziert (siehe Abbildung 3. 7).

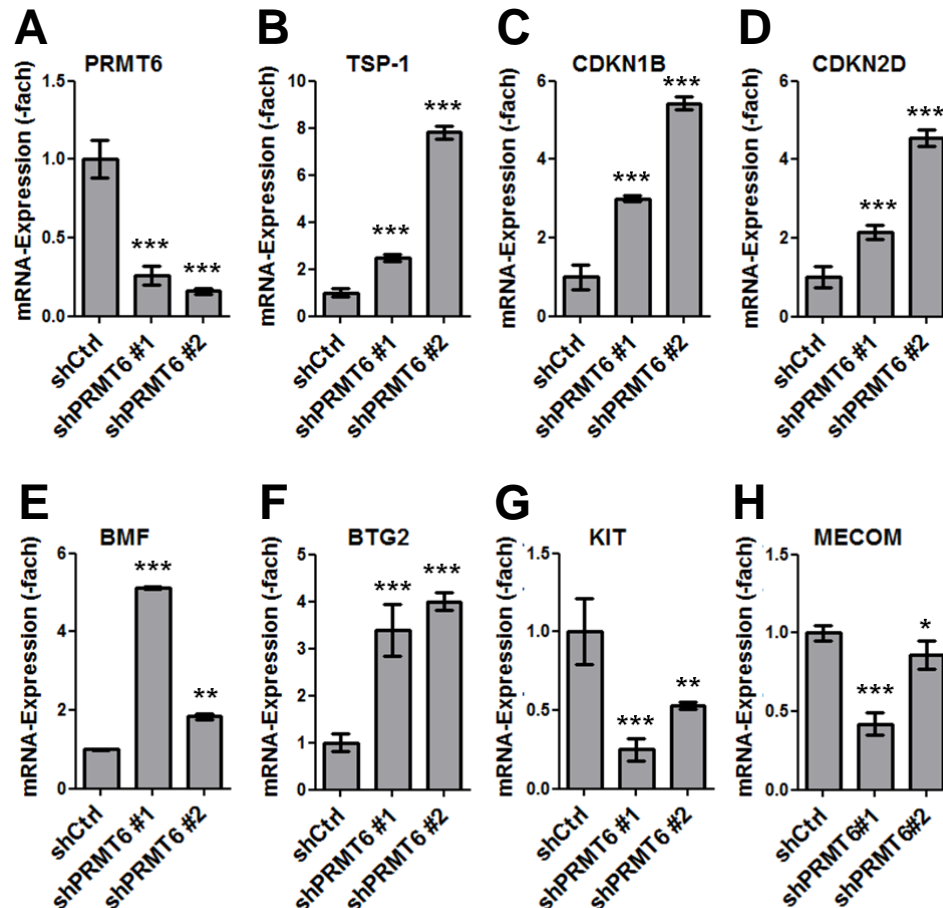


Abbildung 3. 7: Verifizierung der Expressionsveränderungen durch PRMT6-Knockdown. K562 wurden mit zwei verschiedenen shRNA-Konstrukten gegen PRMT6 (shPRMT6 #1 und shPRMT6 #2) oder einer Kontroll-shRNA transduziert und nach sieben Tagen die Expression verschiedener Gene durch quantitative *real-time* PCR analysiert. (A) Der Knockdown von PRMT6 konnte bestätigt werden. (B) TSP-1 ein bereits verifiziertes Zielgen von PRMT6 wurde gemessen. Die Herunterregulation von PRMT6 erhöhte die Expression von *CDKN1B* (C), *CDKN2D* (D), *BMF* (E) und *BTG2* (F). Hingegen konnte eine verminderte Expression bei den Genen *KIT* (G) und *MECOM* (H) nach PRMT6-Knockdown verzeichnet werden. Die Fehlerindikatoren zeigen die Standardabweichung von mindestens vier Bestimmungen und zwei unabhängigen *Knockdown*-Experimenten. Die P-Werte wurden mit Student's t-Test kalkuliert. *P < 0,05, **P < 0,01, ***P < 0,001.

Zunächst wurde der *Knockdown* von PRMT6 verifiziert. Die Expression von PRMT6 wird um etwa 70% herunterreguliert im Vergleich zur Kontrolle. Das schon verifizierte Zielgen *TSP1* (Thrombospondin-1) wird durch PRMT6 hochreguliert, so wie auch schon Stein und Kollegen beschreiben konnten (Stein et al, 2012). Durch eine Herunterregulation von PRMT6 sind die Zellzyklus- und Apoptose-Gene *CDKN1B*, *CDKN2D*, *BMF* und *BTG2* hochreguliert. *KIT* und *MECOM* werden durch PRMT6 ebenfalls herunterreguliert.

Diese Ergebnisse sind mit den zuvor gezeigten Wachstumseffekten in Kapitel 3.1 in Übereinstimmung, da durch die Expressionsergebnisse gezeigt werden konnte, dass der PRMT6-*Knockdown* Zellzyklus- und Apoptose-Gene hochreguliert und die Zellen außerdem ein verringertes Zellwachstum zeigten.

Weiterhin sollte evaluiert werden, ob einige dieser Zielgene auch direkte Zielgene von PRMT6 sind.

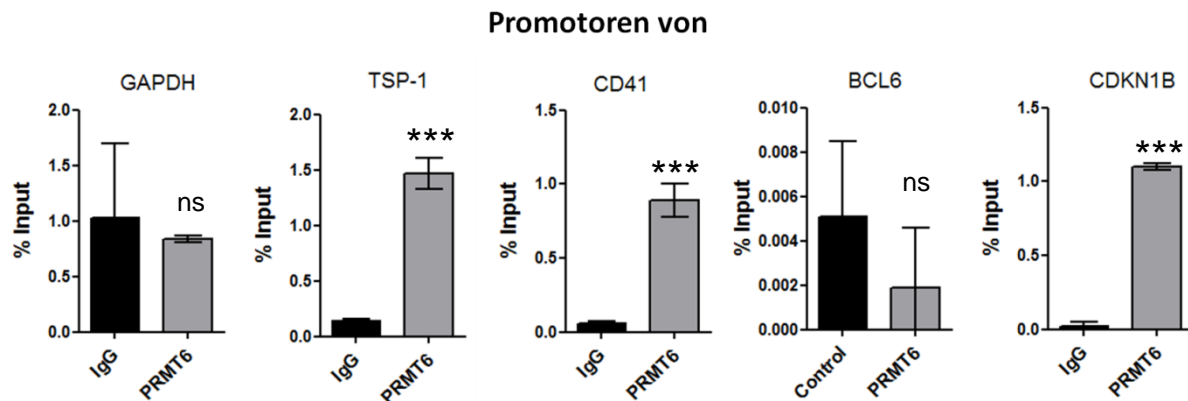


Abbildung 3. 8: Identifizierung direkter Zielgene von PRMT6. Durch einen ChIP-Assay wurde in unbehandelten K562-Zellen mit einem gegen PRMT6 gerichteten Antikörper eine Anreicherung von PRMT6 auf verschiedenen Zielgenen (*GAPDH*, *TSP-1*, *CD41*, *BCL6*, *CDKN1B*) gemessen. Dargestellt ist die prozentuale Anreicherung im Vergleich mit dem Input. Die Fehlerbalken geben die Standardabweichung von drei Replikaten an. Es konnte eine Anreicherung von PRMT6 auf dem Zielgen *TSP-1*, *CD41* und *CDKN1B* detektiert werden, während keine Anreicherung für *GAPDH* und *BCL6* zu verzeichnen war. Die Fehlerindikatoren zeigen die Standardabweichung von mindestens vier Bestimmungen und zwei unabhängigen *Knockdown*-Experimenten. Die P-Werte wurden mit Student's t-Test kalkuliert. ***P < 0,001; ns = nicht signifikant.

Um eine Bindung von einem Protein auf einem Promotor nachzuweisen wurde ein ChIP-Assay mit einem gegen PRMT6 gerichteten Antikörper durchgeführt und anschließend die Anreicherung von PRMT6 auf verschiedenen Zielgenen mittels qPCR gemessen.

TSP-1 und *CD41* dienten dabei als Positiv-Kontrollen, da sie schon verifizierte Zielgene von PRMT6 sind (Herglotz et al, 2013; Michaud-Levesque & Richard, 2009; Stein et al, 2012). Eine Bindung von PRMT6 an den *GAPDH*-Promotor konnte nicht beobachtet werden. Dieses Gen diente als Negativ-Kontrolle, da es in den meisten Zellen sehr aktiv ist und ein *housekeeping*-Gen darstellt. PRMT6 wirkt eher als reprimierender Faktor und ist auf inaktiven Genen vermehrt anzufinden. Für *BCL6* konnte ebenfalls keine Anreicherung auf dem Promotor beobachtet werden. Dieses Gen war in den Expressionsarray-Daten als mögliches Zielgen aufgeführt (siehe Abbildung 3. 6). Anhand des ChIP-Assays ist jedoch festzustellen, dass dieses Gen in dem untersuchten Bereich keine Bindung von PRMT6 an den Promotor zeigt. Auf dem *CDKN1B*-Promotor konnte jedoch eine Anreicherung verzeichnet werden. Somit sollte *CDKN1B*, als ein sehr interessantes Zielgen von PRMT6, weiterhin analysiert werden. Da PRMT6, als enzymatischer Kofaktor, keine DNA-Bindedomäne besitzt und mittels Transkriptionsfaktoren an seine Zielgene rekrutiert werden muss, wurde der Promotor von dem Zellzyklus-Inhibitor *CDKN1B* hinsichtlich potentieller Bindestellen von RUNX1 untersucht und überprüft ob RUNX1 zur Rekrutierung von PRMT6 beiträgt.

3.4 *CDKN1B* ist ein direktes Zielgen von PRMT6

CDKN1B ist ein wichtiges Gen, das in der Regulation des Zellzyklus in der Transition von G1 zur S-Phase involviert ist. Die Serin- und Threonin-Kinasen oder auch Cyclin-abhängige Kinasen (CDKs) genannt, regulieren vorwiegend die Zellzyklus-Entwicklung. CDKs werden durch eine Vielzahl von Mechanismen kontrolliert, darunter eine Gruppe von Molekülen, die die CDK-Aktivität durch eine Komplex-Bildung inhibieren. Diese CDK-Inhibitoren werden in zwei Familien unterteilt, die Cip/Kip (*CDKN1*)- Familie mit drei Mitgliedern in Säugetieren, die alle in der G1/S-Transition involviert sind und die Ink4 (*CDKN2*)- Familie mit vier Mitgliedern, die spezifisch CDK4 und CDK6 inhibieren. Molekularbiologische und Zellkultur-Experimente konnten bereits zeigen, dass CKIs als primäre Effektoren der Signalwege, die den Zellzyklus-Austritt kontrollieren, involviert sind. Die Expression oder die Stabilität der CKIs ist in Tumoren stark reduziert (Besson et al, 2008; Cheng et al, 1999; Sherr & Roberts, 1999; Vidal & Koff, 2000).

Da *CDKN1B* ein direktes Zielgen von PRMT6 darstellt und durch Transkriptionsfaktoren an seine Zielgene rekrutiert werden muss, wurde der Promotor weiterhin mittels Reporter-Gen-Assay untersucht, um die RUNX1-Bindestellen zu identifizieren und die Aktivität des Promotors zu messen. Die Analyse von bereits publizierten ChIP-Seq Daten zeigte, dass der *CDKN1B*-Promotor potentielle RUNX1-Bindestellen enthält, über die dann nach RUNX1-Bindung auch PRMT6 rekrutiert werden könnte (Kent et al, 2002) (siehe Abbildung 3. 9).

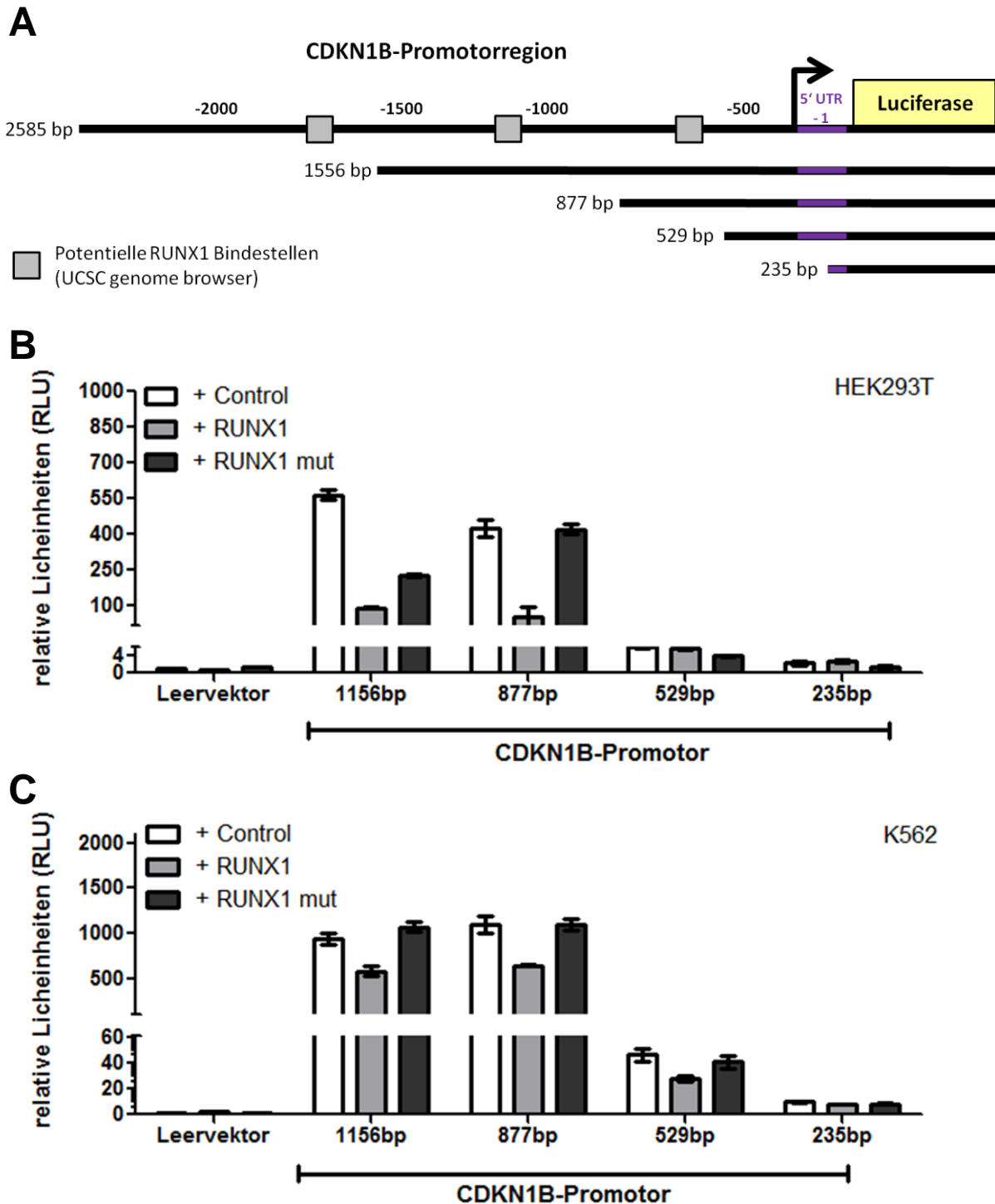


Abbildung 3. 9: Schematische Darstellung des *CDKN1B*-Promotors und der Effekt von RUNX1 auf den *CDKN1B*-Promotor. (A) Es wurden verschieden lange Promotorkonstrukte des *CDKN1B*-Promotors (1156bp, 877bp, 529bp, 235bp) vor das Luciferasegen in den pGL4.10-Vektor kloniert. Potentielle RUNX1-Bindestellen wurden als graue Boxen dargestellt. Der lilafarbene Bereich stellt das 5'UTR von *CDKN1B* dar, das hinter dem Transkriptionsstart liegt. Der Luciferase-Reportergen-Assay wurde in HEK293T (B) und in K562 (C) durchgeführt. Die Zellen wurden mit den verschiedenen *CDKN1B*-Promotorkonstrukten und den Expressionsvektoren für RUNX1 und einer RUNX1-Mutante (RUNX1 mut), die nicht an die DNA binden kann, kotransfiziert. Die Messung der Reportergen-Aktivität erfolgte 48 Stunden nach der Transfektion. Die Werte des Luciferase-Assays wurden in Bezug auf die β -Galactosidase-Werte normalisiert, um Transfektionsunterschiede auszugleichen. Die Luciferase-Aktivität des Leervektors pGL4.10, ohne Promotor, wurde auf 1 gesetzt und die anderen Werte in Relation dazu gesetzt.

Folglich wurden verschieden lange Deletionsmutanten erstellt, um festzustellen welche RUNX1-Bindestelle wichtig für die Transkriptionskontrolle ist. Wenn man die unterschiedlich langen Promotor-Fragmente untereinander vergleicht, kann man erkennen, dass je kürzer das Fragment ist, desto geringer ist die Promotoraktivität. Zusätzlich wurde mit Plasmiden, die entweder RUNX1 oder eine Mutante, die nicht an die DNA binden kann, kotransfiziert, um zu überprüfen, was für einen Effekt die Überexpression von RUNX1 auf die verschiedenen Promotor-Konstrukte hat. Die Überexpression von RUNX1 hat einen reprimierenden Effekt auf die Promotoraktivität von *CDKN1B*. Jedoch ist bei den zwei kleineren Fragmenten, bei denen keine RUNX1-Bindestellen mehr vorhanden sind, kein Unterschied mehr in HEK293T-Zellen zu sehen. In K562 ist bei dem 529bp-Fragment noch ein reprimierender Effekt von RUNX1 zu erkennen, der jedoch dann bei dem kleinsten Fragment wegfällt. Mit der Expression der Mutante wurde wieder eine Aktivität in Höhe der Kontrolle erreicht. Der reprimierende Effekt von RUNX1 war also nicht mehr vorhanden. Abschließend kann festgestellt werden, dass RUNX1 einen Effekt auf die Promotoraktivität hat und die Transkription von *CDKN1B* beeinflussen kann. Durch die Mutante hingegen ist dieser reprimierende Effekt wieder aufgehoben.

Um die Besetzung des Promotors weiterhin zu evaluieren und zu überprüfen, ob RUNX1 und PRMT6 auf dem *CDKN1B*-Promotor zu finden sind, wurde ein ChIP-Assay mit einem gegen RUNX1 oder einem gegen PRMT6 gerichteten Antikörper durchgeführt. Mit verschiedenen Primerpaaren wurden verschiedene Stellen des Promotors abgedeckt, die auf und zwischen den potentiellen RUNX1-Bindestellen liegen (siehe Abbildung 3. 10).

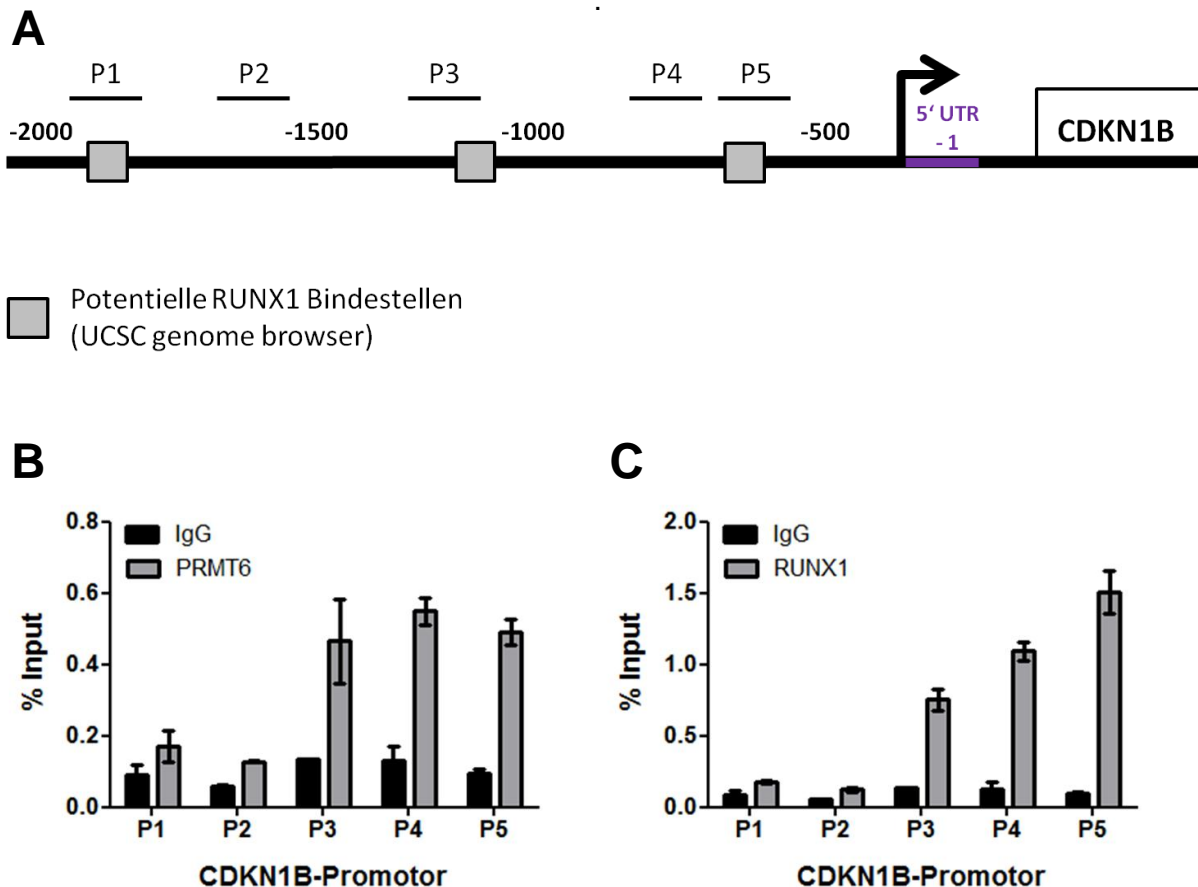


Abbildung 3. 10: Schematische Darstellung und Analyse der Besetzung des CDKN1B-Promotors. (A) Schematische Darstellung des CDKN1B-Promotors mit seinen potentiellen RUNX1-Bindestellen. Die potentiellen RUNX1-Bindestellen, die aus dem UCSC genome browser entnommen wurden, wurden als graue Boxen dargestellt. Der lilafarbene Bereich stellt das 5'UTR des CDKN1B-Promotors dar, welcher direkt vor der codierenden Sequenz des Gens (*CDKN1B*) liegt. Primerpaare, die verschiedene Regionen des CDKN1B-Promotors amplifizieren, wurden in einem ChIP-Assay eingesetzt (P1-P5). Die Besetzung des CDKN1B-Promotors wurde in einer Chromatin-Immunopräzipitation mit einem gegen PRMT6 (B) und einem gegen RUNX1 (C) gerichteten Antikörper untersucht und verschiedene Stellen des Promotors mit fünf unterschiedlichen Primerpaaren (P1-P5) amplifiziert. Das ChIP-Experiment wurde mit K562-Zellen durchgeführt. (B) Mit einem gegen PRMT6 gerichteten Antikörper, konnte insbesondere eine Anreicherung im Bereich von P3-P5 gezeigt werden. (C) In einem ChIP-Experiment mit einem gegen RUNX1 gerichteten Antikörper konnte ebenfalls eine Anreicherung im Bereich von P3-P5 gefunden werden. Die Anreicherung auf dem Promotor wird als Prozent Input dargestellt. Die Fehlerbalken geben die Standardabweichung von mindestens drei Replikaten an.

Man kann feststellen, dass eine Bindung von RUNX1 an den Promotor von *CDKN1B* eher im Bereich des Transkriptionsstarts vorkommt (P3-P5). Für P1 und P2 konnte keine Bindung festgestellt werden. Zusätzlich kann man erkennen, dass PRMT6 ein ähnliches Bindeprofil wie RUNX1 hat. Im Bereich P1 und P2 ist keine PRMT6-Anreicherung vorhanden, während in den Bereichen der Primer P3, P4 und P5 eine starke Anreicherung von PRMT6 ersichtlich wird. Dies weist darauf hin, dass PRMT6 und RUNX1 womöglich zusammen auf dem Promotor des *CDKN1B*-Gens sitzen und seine Expression regulieren.

Da *CDKN1B* ein interessantes und direktes Zielgen von PRMT6 darstellt, könnte eine Inhibition von PRMT6 eine Möglichkeit sein die Expression von PRMT6-Zielgenen zu regulieren.

Eine Inhibition ist durch *small molecules* möglich, die an ihre Zielproteine binden und somit blockieren. Dabei könnte eine Inhibition von PRMT6 durch *small molecules* ähnliche Effekte, wie ein lentiviraler *Knockdown* von PRMT6 durch shRNAs zur Folge haben. Aus diesem Grund sollten nun verschiedene Inhibitoren von PRMT6 getestet werden.

3.5 Neue PRMT6-Inhibitoren beeinflussen das Zellwachstum und die *CDKN1B*-Expression

Epigenetische Mechanismen haben in der Kontrolle von biologischen Prozessen eine Schlüsselrolle. Chromatin-Veränderungen können eine Rolle in der Progression von vielen Krankheiten, wie zum Beispiel Krebs, spielen. Die posttranslationale Methylierung von Histonen stellt einer dieser Prozesse dar. Eine Dysregulation von diesen Modifikationen konnte schon mit vielen verschiedenen Typen von Krebs assoziiert werden (Easwaran et al, 2014; Meaney & Ferguson-Smith, 2010). Kleine Molekülinhibitor oder auch *small molecule* – Inhibitoren genannt, die auf Methyltransferasen oder auch Demethylasen abzielen, konnten schon als Krebs-Medikamente eingesetzt werden (Bowers et al, 2010; Kelly et al, 2010; Mann et al, 2007; San-Miguel et al, 2014; Santini et al, 2013). Weiterführende klinische Studien, die sich diesen Medikamenten widmen sind momentan noch in der Entwicklung.

Aus diesem Grund sind Medikamente, die gegen epigenetische Enzyme gerichtet sind eine geeignete Therapie, da epigenetische Veränderungen potentiell auf die Tochterzellen weitergegeben werden können ohne eine andauernde Medikation. Eine Inhibition von epigenetischen Enzymen durch *small molecules* konnte schon für Histondeacetylasen gezeigt werden, die sogenannten HDAC-Inhibitoren (HDACi), die immer noch erfolgreich in der Krebstherapie eingesetzt werden (Heerboth et al, 2014). Da aber noch keine wirksamen Inhibitoren gegen PRMT6 für die Krebstherapie entwickelt worden sind, die in der Leukämie-Therapie eingesetzt werden könnten, sollten in dieser Arbeit neue PRMT6-Inhibitoren getestet werden.

Die verschiedenen PRMT6-Inhibitoren wurden von den Kooperationspartnern Prof. Manfred Jung (Freiburg) und Prof. Wolfgang Sippl (Halle) bereit gestellt. Zunächst wurde die IC_{50} -Konzentration der verschiedenen PRMT6-Inhibitoren mittels XTT-Assay bestimmt. Mit einem XTT-Assay kann die Zellviabilität festgestellt werden. Somit wurde die IC_{50} -Konzentration auf die Inhibierung des Zellwachstums bzw der Zellviabilität in K562 titriert.

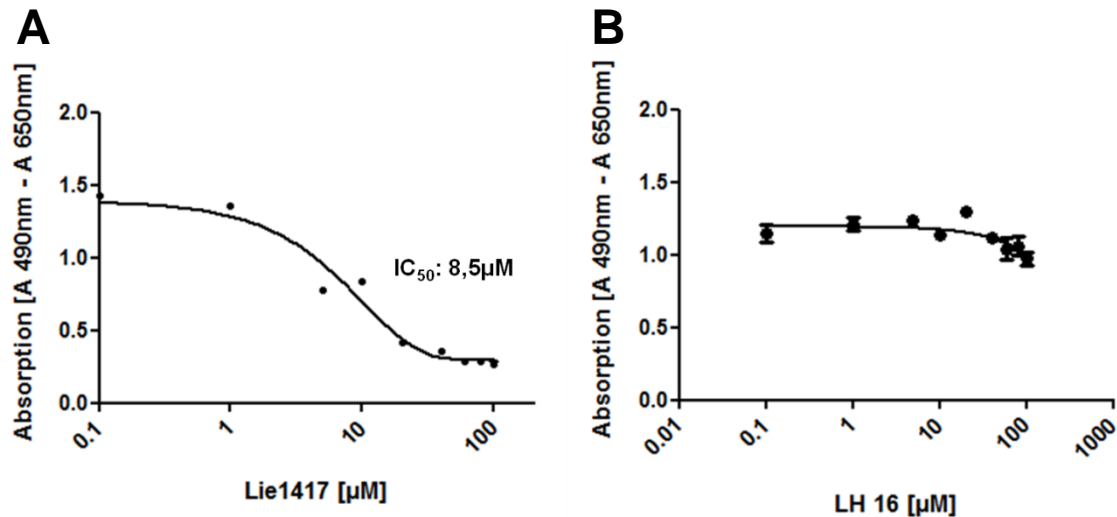


Abbildung 3. 11: Darstellung der Bestimmung der IC_{50} -Konzentration der PRMT6-Inhibitoren mittels XTT-Assay. K562-Zellen wurden ausgesät und zwei Tage mit unterschiedlichen Konzentrationen der verschiedenen Inhibitoren Lie1417 (A) und LH16 (B) behandelt. Anschließend wurde das Tetrazoliumsalz XTT zu den Zellen hinzugegeben, die Zellen 2 h im Brutschrank inkubiert und das umgesetzte Formazan als Absorption bei 490 nm in einem Spektrometer gemessen. Als Referenz wird außerdem die Absorption bei Wellenlänge 650 nm gemessen und von den Werten abgezogen.

Durch den XTT-Assay konnten die PRMT6-Inhibitoren ermittelt werden, die einen inhibierenden Effekt auf das Zellwachstum hatten und demnach eine Wirkung zeigten, die mit der wachstumsinhibierenden Funktion zusammenhängt, wenn PRMT6 nicht vorhanden ist. Dafür wurden die Zellen zwei Tage mit den verschiedenen Inhibitoren in verschiedenen Konzentrationen inkubiert und darauffolgend die Zellviabilität mittels XTT-Assay als Absorption gemessen. In Abbildung 3. 11 A ist ein Inhibitor dargestellt, der einen wachstumsinhibierenden Effekt mit steigender Konzentration hat. Man kann bei solch einer sigmoidalen Kurve den IC_{50} -Wert bestimmen, der den Wendepunkt der Kurve darstellt. Für den PRMT6-Inhibitor, Lie1417, liegt dieser Wert bei 8,5 μM . Andere getesteten Inhibitoren, wie exemplarisch für LH-16 in Abbildung 3. 11 B dargestellt, zeigten keinen wachstumsinhibierenden Effekt und somit konnte auch kein IC_{50} -Wert ermittelt werden. Alle Ergebnisse der getesteten Inhibitoren werden nochmals in Tabelle 3. 1 zusammengefasst dargestellt. Jeder IC_{50} -Wert für die verschiedenen Inhibitoren wurde wie oben beschrieben ermittelt und eine Kurve erstellt (Daten nicht gezeigt).

Von den 13 getesteten Inhibitoren zeigten sechs Inhibitoren keinen wachstumsinhibierenden Effekt, während für die weiteren Inhibitoren ein IC_{50} -Wert berechnet werden konnte (siehe Tabelle 3. 1). Der IC_{50} -Wert variiert zwischen 8,5 μM und 75 μM , wobei der Inhibitor Lie1417 die niedrigste IC_{50} -Konzentration besitzt und der Inhibitor BSF2 die höchste Konzentration.

Tabelle 3. 1: IC₅₀-Konzentrationsbestimmung der PRMT6-Inhibitoren anhand des Zellwachstums bzw. Zellviabilität. Es wurde ein XTT-Assay für 11 verschiedene neue PRMT6-Inhibitoren in K562 Zellen durchgeführt. Dabei ergaben sich bei manchen Inhibitoren keine wachstumshemmenden Effekte auf die K662 Zellen und bei sieben Inhibitoren konnte eine IC₅₀-Konzentration ermittelt werden.

PRMT6-Inhibitoren	IC ₅₀ -Konzentration in K562-Zellen anhand des Zellwachstums (XTT-Assay)
Lie1417	8,5 µM
LH 16	Kein wachstumshemmender Effekt
BSF2	75 µM
BSF3	Kein wachstumshemmender Effekt
BSF6	34 µM
BSF12	Kein wachstumshemmender Effekt
BSF15	Kein wachstumshemmender Effekt
BSF18	Kein wachstumshemmender Effekt
BSF20	54 µM
BSF31	41 µM
BSF38	20 µM
BSF39	40 µM
BSG1	Kein wachstumshemmender Effekt

Die Inhibitoren, die einen Effekt auf die K562-Zellen hatten, wurden anschließend auf die Expression von CDKN1B überprüft, da zuvor gezeigt werden konnte, dass der *Knockdown* von PRMT6 ebenfalls einen Effekt auf die Expression von CDKN1B hat (siehe Kapitel 3.3.). Weiterhin wurde zur Kontrolle die Expression von PRMT6 überprüft, da die Inhibitoren in dem enzymatischen Reaktionszentrum von PRMT6 binden und die Expression dadurch nicht verändert werden sollte. K562-Zellen wurden dafür zwei Tage mit den jeweiligen Inhibitoren und ihrer jeweiligen ermittelten IC₅₀-Konzentration behandelt und die Expression von CDKN1B und PRMT6 mittels quantitativer PCR bestimmt (siehe Abbildung 3. 12).

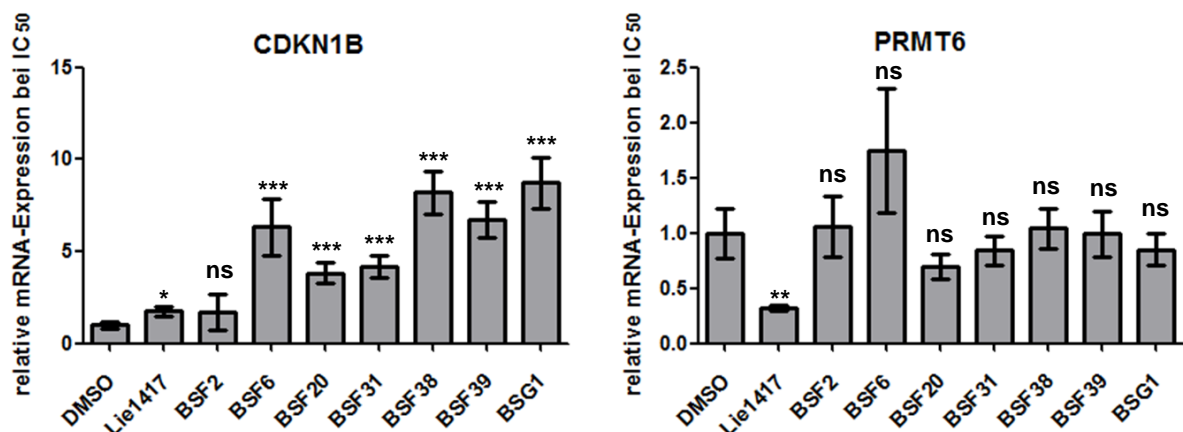


Abbildung 3. 12: Expressionsveränderungen durch PRMT6-Inhibition. K562-Zellen wurden zwei Tage mit verschiedenen PRMT6-Inhibitoren (Lie1417, BSF2, BSF6, BSF20, BSF31, BSF38, BSF39, BSG1) mit ihrer jeweiligen IC₅₀-Konzentration behandelt. Die Expression von CDKN1B und PRMT6 wurde durch quantitative *real-time* PCR bestimmt. Die CDKN1B-Expression erhöhte sich mit der Behandlung von allen Inhibitoren. Für BSF2 ist jedoch keine signifikante Erhöhung zu verzeichnen. Die PRMT6-Expression mit Inhibitor-Behandlung veränderte sich im Vergleich zur Kontrolle nicht. Eine Ausnahme stellt der Inhibitor Lie1417 dar, bei dem sich die Expression signifikant erniedrigte. Die Fehlerindikatoren zeigen die Standardabweichung von mindestens vier Bestimmungen und drei unabhängigen Inhibitor-Experimenten. Die P-Werte wurden mit Student's t-Test kalkuliert. **P < 0,01, ***P < 0,001.

Die Behandlung der K562-Zellen mit den neu entwickelten Inhibitoren in ihrer jeweiligen IC_{50} -Konzentration führt nach 2 Tagen in allen Fällen zu einer gesteigerten Expression von *CDKN1B*. Eine Ausnahme stellt die Behandlung mit dem Inhibitor BSF2 dar. Ebenso hat der Inhibitor Lie1417 einen weniger starken Effekt auf die Expression von *CDKN1B* im Vergleich zu den anderen getesteten Inhibitoren, jedoch konnte eine leichte Erhöhung im Vergleich zur Kontrolle festgestellt werden. Die Expression von PRMT6 veränderte sich mit Inhibitor-Behandlung nicht signifikant, jedoch konnte für den Inhibitor Lie1417 eine Reduzierung des PRMT6-RNA-Levels verzeichnet werden.

Um zu überprüfen, ob der wachstumsinhibierende Effekt des Inhibitors Lie1417, der die niedrigste IC_{50} -Konzentration im XTT-Assay aufwies, auf eine Veränderung im Zellzyklus beruht, wurde eine Zellzyklus-Analyse der verschiedenen Proben durchgeführt. Die DNA wird durch Propidiumiodid gefärbt, da dieser Farbstoff in die DNA interkaliert. Dies kann anschließend mit einem FACS-Gerät analysiert werden.

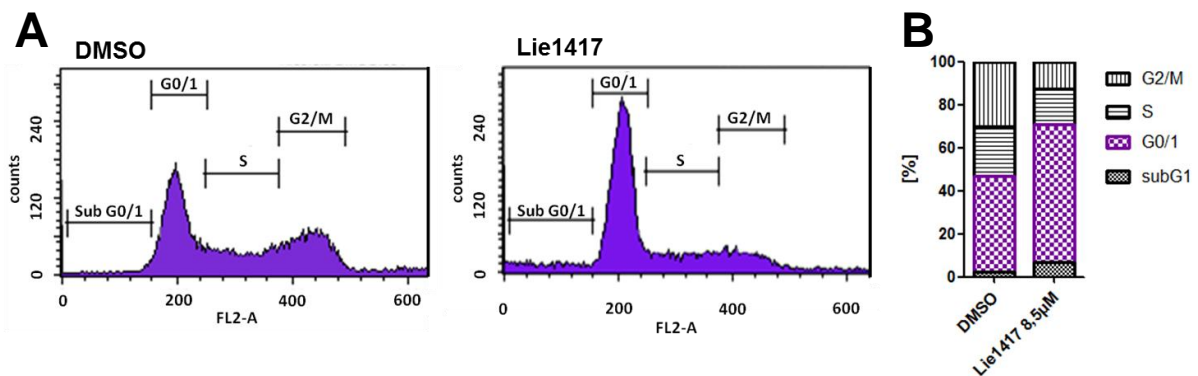


Abbildung 3. 13: Zellzyklus-Analyse der mit Lie1417-behandelten K562-Zellen. K562-Zellen wurden zwei Tage in Zellkultur entweder mit 8,5 µM Lie1417 oder mit DMSO, als Kontrolle, behandelt. Anschließend wurden die Zellen fixiert und mit RNase und Propidiumiodid (50 µg/ml) inkubiert. Mittels FACS-Analyse konnte der DNA-Gehalt im FL2-A-Kanal gemessen und somit die unterschiedlichen Zellzyklusstadien dargestellt werden (sub G0/1, G0/1, S, G2/M). (B) Die prozentualen Anteile der Zellen in den verschiedenen Zellzyklusphasen werden dargestellt. Die Zellen, die mit dem Inhibitor behandelt wurden, zeigen einen höheren Anteil an Zellen auf, die sich in der subG1- und G1- Phase befinden, im Vergleich zur Kontrolle.

Die K562-Zellen, die mit DMSO behandelt wurden weisen Zellen auf, die sich in der G0/1-Phase befinden, aber auch einen Anteil der Zellen, die sich in der G2/M-Phase befinden. Im Vergleich dazu zeigen die Inhibitor-behandelten Zellen einer Erhöhung der Zellen, die sich in der G1-Phase befinden, während weniger Zellen in der G2/M-Phase zu finden sind (A). Dieser Unterschied wird auch in B sehr deutlich, da die prozentualen Anteile der Zellen in den jeweiligen Zellzyklusphasen der verschiedenen Behandlungen gegenübergestellt sind. Die mit Lie1417-behandelten Zellen weisen mehr Zellen in der subG0/1-Phase und einen größeren Anteil in der G0/1-Phase. Kontrollzellen haben 44% in der G1-Phase, während sich für

die Inhibitor-Zellen 64% der Zellen in der G0/1-Phase befinden. Außerdem ist eine Reduktion von 30% auf 12% der Inhibitor-Zellen in der G2/M-Phase festzustellen. Zusammenfassend verursacht eine Inhibition von PRMT6 mit dem Inhibitor Lie1417 einen G1-Arrest und daraus folgend eine Abnahme der Zellen in der G2/M-Phase.

Abschließend kann festgestellt werden, dass PRMT6 ein potentielles therapeutisches Ziel für eine epigenetische Therapie darstellt. Es konnte gezeigt werden, dass Inhibitoren von PRMT6 ähnlich, wie der *Knockdown* das Zellwachstum beeinflussen und einen wachstumsinhibierenden Effekt haben. Ebenso konnte dargestellt werden, dass die Expression von PRMT6-Zielgenen durch die Inhibitor-Behandlung erhöht wird, sodass von einer gewissen Spezifität der Inhibitoren gesprochen werden kann.

Interessanterweise können Inhibitoren auch zur Differenzierung hämatopoetischer Zellen eingesetzt werden. Es können beispielsweise small molecules verwendet werden, um eine erythroide Differenzierung zu initiieren (Olivier et al, 2016). Weiterhin konnte gezeigt werden, dass p27 (CDKN1B) die Differenzierung von hämatopoetischen Zellen beeinflusst. Eine Überexpression von p21 oder p27 in verschiedenen Zelllinien induziert eine monozytäre (Liu et al, 1996; Muto et al, 1999; Rots et al, 1999; Zhou et al, 1999) oder megakaryozytäre (Kikuchi et al, 1997; Matsumura et al, 1997) Differenzierung. Durch die Gruppe um Munoz Alonso und Kollegen konnte jedoch gezeigt werden, dass p27 spezifisch in der erythroiden Differenzierung agiert. So konnten gezeigt werden, dass eine ektopische Expression von p27 in K562-Zellen zu einer Expression erythroider Marker führt. Außerdem wird p27 signifikant hochreguliert, wenn eine erythroide Differenzierung von K562-Zellen durch AraC (Cytarabin) induziert wird (Munoz-Alonso et al, 2005). Da p27 ein direktes Zielgen von PRMT6 darstellt ist weiterhin interessant herauszufinden, ob PRMT6 ebenfalls die hämatopoetische Differenzierung beeinflusst und auch eine Funktion in der erythroiden Differenzierung hat.

3.6 PRMT6 inhibiert die Erythropoese

Herglotz et al. 2012 konnte zeigen, dass PRMT6 mit RUNX1 auf megakaryozytären Genen in Vorläuferzellen assoziiert ist. Somit konnte beschrieben werden, dass PRMT6 einen Effekt in der Differenzierung von Megakaryozyten hat. Weiterhin konnte durch die Arbeit von Kuwardina et al. 2016 gezeigt werden, dass RUNX1 als ein Aktivator oder Repressor während der megakaryozytären Differenzierung wirken kann und der Aktivität von TAL1 entgegen-

wirkt. Außerdem inhibiert RUNX1 die erythroide Differenzierung durch Herunterregulation des erythroiden Genexpressionsprogramms. Diese Funktion, als Repressor erythroider Gene, könnte teilweise durch PRMT6 vermittelt sein. Somit könnte PRMT6 eine Rolle in der Kontrolle der Genexpression an dem erythroiden/megakaryozytären Verzweigungspunkt inne haben und die Differenzierung beeinflussen.

Aus diesem Grund wurden zunächst Differenzierungsversuche mit humanen CD34+-Zellen durchgeführt. Dafür wurden diese Zellen mit Konstrukten für eine PRMT6-Überexpression oder mit *Knockdown*-Konstrukten transduziert. Anschließend wurden die Zellen mittels FACS sortiert und für einen CFU-Assay in Methylcellulose ausgesät, um einen Effekt auf die Differenzierung zu untersuchen.

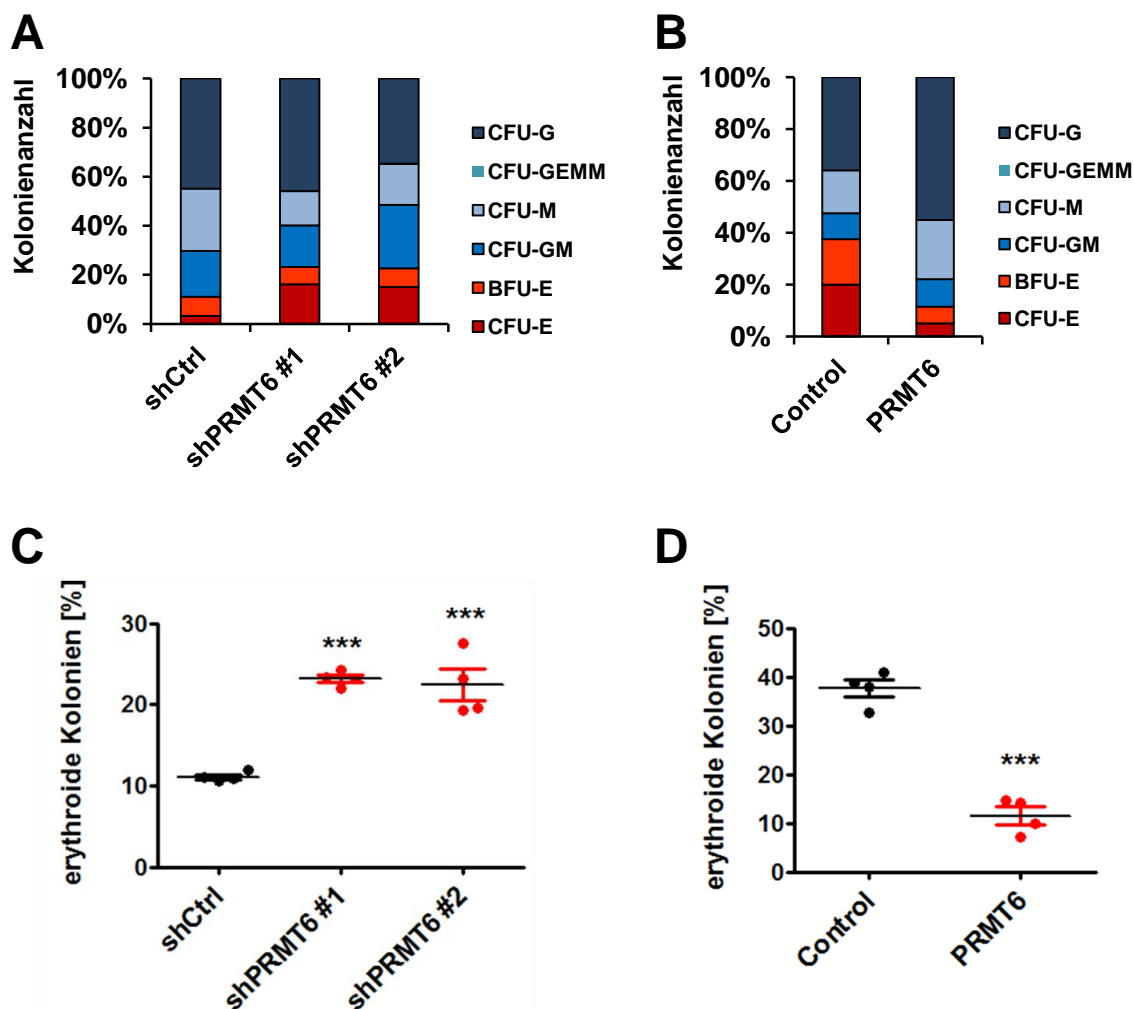


Abbildung 3. 14: Einfluss der PRMT6-Manipulation auf die erythroide Differenzierung. Humane CD34+-Zellen wurden mit einem PRMT6 Überexpressionsvektor (PRMT6), einem *Knockdown*-Vektor oder den dazugehörigen Kontrollvektoren (shCtrl oder Control) transduziert. Die transduzierten GFP-positiven Zellen wurden mittels FACS sortiert und anschließend für das CFU assay in Methylcellulose ausgesät. Die unterschiedlichen Kolonien, wurden nach 10-14 Tagen ausgezählt (A und B). Der Knockdown von PRMT6 wurde durch die Benutzung von zwei unterschiedlichen shRNAs (shPRMT6#1, shPRMT6#2) erreicht und zeigt eine Veränderung der prozentualen Kolonieanteile im Vergleich zur Kontrolle (A). Die Überexpression von PRMT6 führte auch zu einer Veränderung der prozentualen Kolonieanteile (B). Die Veränderung der prozentualen Anteile der erythroiden Kolonien der Überexpressionszellen (C) und der *Knockdown*-Zellen (D) wird detaillierter abgebildet und stellt die addierten Anteile der CFU-E und BFU-E Kolonien dar. Die p-Werte wurden mit Hilfe des Student's t-test ermittelt. ***P < 0,001; n. s. = nicht signifikant.

CFU-G = Granulozyten-Kolonien, CFU-GEMM = Granulozyten-, Erythrozyten-, Monozyten- und Megakaryozyten-Kolonien, CFU-M = Monozyten-Kolonien, CFU-GM = Granulozyten/Monozyten-Kolonien, BFU-E = burst forming erythrocyte colony (Erythrozyten-Kolonie), CFU-E = colony forming erythrocyte colony (kleine Erythrozyten-Kolonie).

Diese Ergebnisse sind in der Publikation von Herkt et al (2017) veröffentlicht.

Die prozentualen Anteile der verschiedenen Kolonien, die bei den unterschiedlichen Transduktionen der Zellen entstehen, wurden bestimmt (siehe Abbildung 3. 14 A und B). Dabei ist festzustellen, dass der prozentuale Anteil der CFU-E Kolonien bei den *Knockdown*-Zellen deutlich größer ist, während er bei den Überexpressionszellen im Gegensatz zur Kontrolle erheblich kleiner wird. Weiterhin sind die Granulozyten-Kolonien (CFU-G) bei den CD34+-Zellen mit PRMT6-Überexpression erheblich größer. Zudem wird die Anzahl der Monozyten-Kolonien in den *Knockdown*-Zellen im Vergleich zu der Kontrolle geringer. Der Effekt auf die erythroiden Kolonien wird nochmals in Abbildung 3. 14 C und D deutlich, bei denen die Anzahlen der erythroiden Kolonien (CFU-E und BFU-E) addiert wurden und der prozentuale Anteil an den Gesamtkolonieanzahlen errechnet wurde. Dabei zeigt sich, dass der *Knockdown* einen steigenden Effekt auf die erythroiden Kolonien hat, während eine Überexpression von PRMT6 zu einer Verringerung der Kolonien führt. Unterschiede der prozentualen Kontrollen kann auf die unterschiedlichen *backbone*-Vektoren und auf unterschiedliche Spender zurückgeführt werden, bei denen unterschiedliche erythroide prozentuale Anzahlen der erythroiden Kolonien zustande kommen können.

Ferner wurde auch die Gesamtkolonieanzahl für beide Konstrukte ausgezählt, die zuvor in Kapitel 3.1 beschrieben wurde. Dabei konnte festgestellt werden, dass der PRMT6-*Knockdown* einen inhibierenden Effekt auf die Gesamtkolonieanzahl hat, eine Überexpression jedoch keine Veränderung zeigt. Aus diesem Grund wurden für diesen Versuch die prozentualen Anteile der verschiedenen Kolonien bestimmt, um Veränderungen der verschiedenen Sub-Kolonien darzustellen.

Außerdem wurde dieser Versuch mit murinen *lineage* -negativen Zellen, die aus dem Knochenmark von Mäusen gewonnen wurden, durchgeführt. Dafür wurden Knochenmarkszellen aus *Tibia* und *Femur* von Mäusen isoliert und anschließend mittels MACS-Separation, die differenzierten Zellen depletiert (*lineage negative depletion-Kit*). Danach wurden diese Zellen

mit einem Überexpressionsvektor für PRMT6 transduziert und für das CFU-Assay in Methylcellulose ausgesät. Anschließend wurden die GFP-positiven Kolonien ausgezählt (siehe Abbildung 3. 15).

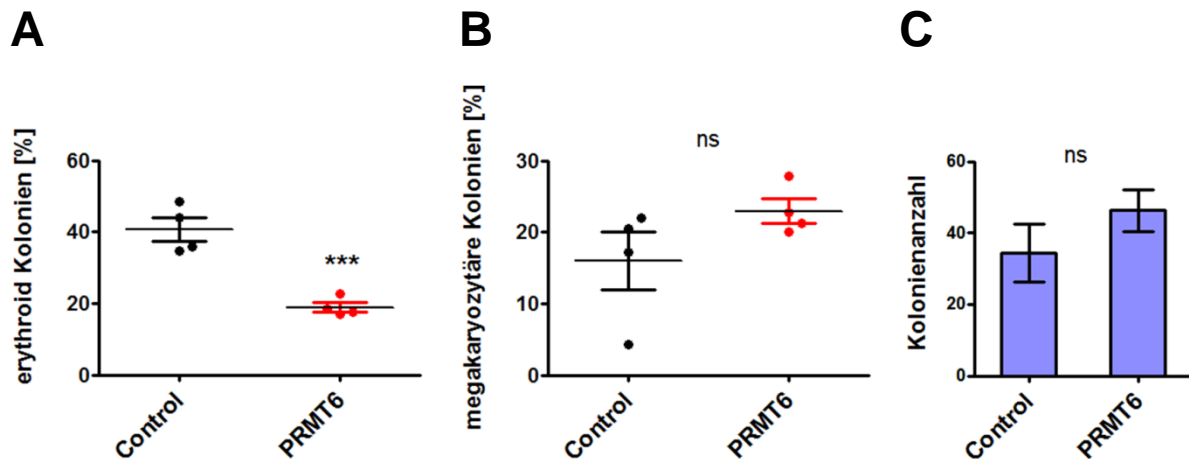


Abbildung 3. 15: Einfluss von PRMT6 auf die erythroide und megakaryozytäre Differenzierung. Murine *lineage*-negative Zellen wurden mit einem PRMT6-Überexpressionsvektor (PRMT6) oder dem zugehörigen Kontrollvektor (Control) transduziert. Die transduzierten GFP-positiven Zellen wurden für das CFU-Assay in Methylcellulose ausgesät und die unterschiedlichen Kolonien nach 14 Tagen ausgezählt. Es wurden die erythroiden Kolonien (A) sowie die megakaryozytären Kolonien (B) bestimmt. (A) Die Überexpression von PRMT6 führt zu einer Verringerung der prozentualen Anteile der erythroiden Kolonien im Vergleich zur Kontrolle. (B) Zudem konnte ebenfalls eine Veränderung der megakaryozytären Kolonien detektiert werden, die in einer Erhöhung resultierte. Die prozentualen Anteile der erythroiden Kolonien ergeben sich aus den addierten Anteilen der CFU-E und BFU-E Kolonien in Bezug zu den Gesamtkolonien. Die p-Werte wurden mit Hilfe des Student's t-test ermittelt. ***P < 0,001; n. s. = nicht signifikant.

Eine Überexpression von PRMT6 hat auch in Zellen murinen Ursprungs einen verringerten Effekt auf die erythroide Kolonienanzahl (siehe Abbildung 3. 15 A). Ein Vorteil bei dem CFU-Assay mit murinen Zellen gegenüber dem mit den humanen Zellen ist, dass sogar megakaryozytäre Kolonien ausgezählt werden können. Die megakaryozytären Kolonien erhöhen sich leicht mit PRMT6-Überexpression (siehe Abbildung 3. 15 B). Dieser Unterschied ist jedoch nicht signifikant und weist nur auf eine Veränderung der Balance zwischen megakaryozytärer und erythroider Entwicklung hin. In der Gesamtkolonienanzahl unterscheiden sich die Überexpression- und die Kontrollzellen nicht (siehe Abbildung 3. 15 C).

Zusammenfassend konnte gezeigt werden, dass eine Veränderung der erythroiden Kolonien sowohl in humanen, als auch in murinen Zellen, durch die Manipulation von PRMT6 gezeigt werden konnte. Dieser Effekt wurde nun weiterhin auf molekularer Ebene untersucht.

3.7 PRMT6 reprimiert das erythroide Genexpressionsprogramm

Da PRMT6 einen Einfluss auf die erythroide Entwicklung zu haben scheint und in der Literatur noch von keinem Zusammenhang von PRMT6 in der hämatopoetischen Differenzierung berichtet wurde, sollten zunächst die Genexpressionsdaten nach Veränderung von PRMT6 analysiert werden. Dadurch können verschiedene Gene identifiziert werden, die durch PRMT6 reguliert werden. Diese könnten dann mögliche Zielgene von PRMT6 darstellen.

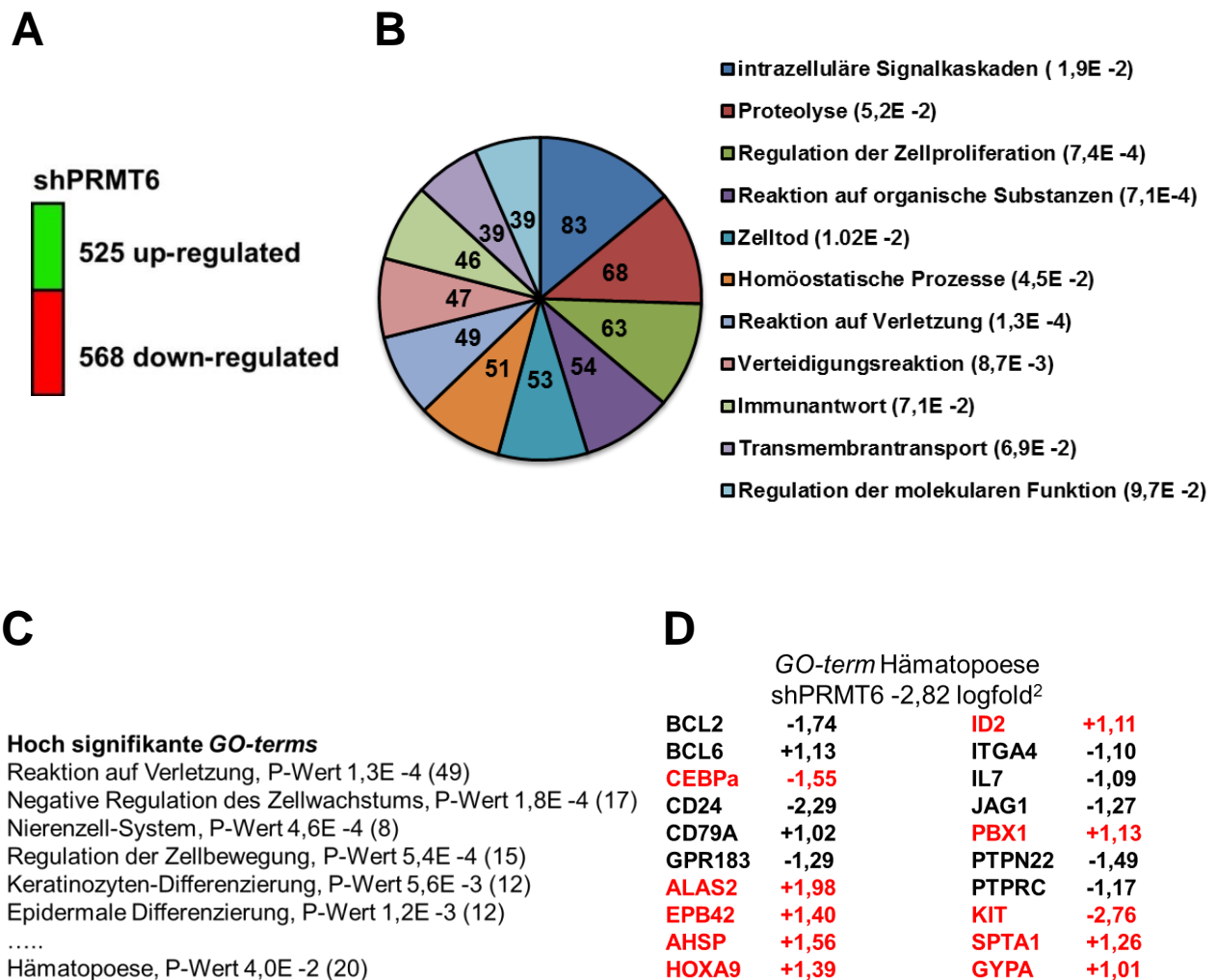


Abbildung 3. 16: Genexpressionsanalyse nach Herunterregulation von PRMT6. Für die *Microarray*- Genexpressionsanalyse wurden K562 fünf Tage nach Transduktion mit einem Knockdown-Konstrukt analysiert. (A) Der *Knockdown* von PRMT6 resultierte in eine Veränderung der Expression von 1093 Genen. Davon waren 525 Gene hochreguliert und 568 Gene herunterreguliert nach PRMT6-*Knockdown*. (B) Eine Gen-Ontologie-Analyse (GO-Term) der veränderten Gene zeigt eine Involvierung in verschiedene biologische Prozesse. Das Kuchendiagramm zeigt die angereicherten GO-terms mit den Anzahlen der involvierten Gene. Die Gen-Ontologie-Analyse wurde mittels *DAVID annotation tool* mit den Standard-Einstellungen durchgeführt. In Klammern in der Legende werden die P-Werte der hoch signifikanten GO-terms gezeigt. (C) Es werden weitere hoch signifikante GO-terms mit ihren P-Werten gezeigt. In Klammern wird die Anzahl der veränderten Gene gelistet. (D) Gene, die mit der Hämatopoese assoziiert sind werden gezeigt und eine Hoch- oder Herunterregulation angegeben. Die Nummern geben Aufschluss über eine Veränderung nach PRMT6 *Knockdown* als logfold². PRMT6 Expression ist reduziert auf -2,82 logfold² im Vergleich zur Kontrolle, die eine nicht-zielgerichtete shRNA enthielt. Gene, die in rot hervorgehoben sind, haben eine beschriebene Rolle in der Erythropoese.

Diese Ergebnisse sind in der Publikation von Herkt et al (2017) veröffentlicht.

Die Genexpressionsdaten nach PRMT6-*Knockdown* in der Leukämie-Zelllinie K562 wurde nun analysiert, um herauszufinden, ob PRMT6 die erythroide Differenzierung beeinflusst. Die *Microarray*-Genexpressionsanalyse wurde fünf Tage nach Transduktion mit einem shRNA-Konstrukt gegen PRMT6 durchgeführt. Wie schon in Kapitel 3. 3 beschrieben resultierte die Herunterregulation von PRMT6 in K562-Zellen in eine Veränderung von mehr als 1000 Genen. Von diesen Genen wurden 525 Gene nach PRMT6-*Knockdown* hochreguliert und 566 Gene herunterreguliert. Darunter waren auch Gene, wie *CDKN1B* (cyclin-abhängiger Kinase-Inhibitor 1B) und *TSP1* (Thrombospondin-1), die mehr als eine zweifache Veränderung nach PRMT6-*Knockdown* aufwiesen. Diese beiden Gene konnten schon als PRMT6 Zielgene beschrieben werden (Kleinschmidt et al, 2012; Michaud-Levesque & Richard, 2009). Des Weiteren wurde eine Gen-Ontologie-Analyse (*GO-term*) durchgeführt, um herauszufinden in welche biologischen Prozesse die veränderten Gene involviert sind. *Gene Ontology* (GO) ist eine Bioinformatik-Initiative, um eine einheitliche Einordnung von Genen in den Biowissenschaften zu erreichen. Resultat sind Ontologie-Datenbanken, die weltweit von vielen Datenbanken genutzt und fortlaufend weiterentwickelt werden. Dabei können verschiedene Datenbanken benutzt werden, um diese Einordnung der Gene in biologische Prozesse zu erreichen. In dieser Arbeit wurde das „DAVID *functional annotation tool*“ verwendet und in einem Kuchendiagramm die angereicherten *GO-terms* der veränderten Gene dargestellt (Huang da et al, 2009a; Huang da et al, 2009b; Huang da et al, 2009c).

Die nach PRMT6-*Knockdown* veränderten Gene sind in biologischen Prozessen, wie in intrazelluläre Signalkaskaden, Regulation der Zellproliferation, Immunantwort, Zelltod und in homöostatischen Prozessen beteiligt (Abbildung 3. 16 B). Die angereicherten *GO-terms* mit der höchsten Signifikanz stellten die Kategorien ‚Reaktion auf Verletzung‘ und die ‚negative Regulation des Zellwachstums‘ dar (Abbildung 3. 16 C). Unter den hoch signifikant angereicherten *GO-terms*, befand sich auch die Kategorie Hämatopoese, in der Gene verändert sind, die auch die Erythropoese beeinflussen können. In Abbildung 3.16 D sind die Gene des *GO-terms* Hämatopoese dargestellt die nach PRMT6-*Knockdown* verändert sind. Zehn der Zwanzig Gene haben eine bekannte Funktion in der Erythropoese und wurden in rot abgebildet. Die meisten dieser erythroid-spezifischen Gene sind hochreguliert, wie an dem positiven $\log\text{fold}^2$ -Wert zu erkennen ist. Unter diesen Gene befindet sich zum Beispiel ALAS2 (Delta-Aminolävulinatsynthase 2), welches eine Rolle in der Häm-Biosynthese innehat, AHSP (alpha-Hämoglobin-stabilisierendes Protein) und der erythroide Differenzierungsmarker GYPA (Glykophorin A). CEBP α (CCAAT/*Enhancer-Binding-Protein* alpha) und c-KIT (Tyrosinkinase KIT) waren durch den PRMT6-*Knockdown* herunterreguliert. CEBP α ist im hämatopoetischen System ausschließlich in myelomonocytischen Zellen exprimiert und spielt außerdem eine Rolle in der Leukämie-Entwicklung (Avellino & Delwel, 2017; Pabst et al, 2001a; Pabst et al, 2001b).

c-KIT ist in hämatopoetischen Stamm- und Vorläuferzellen exprimiert und wird während der Differenzierung zu colony-forming-unit erythroiden Zellen herunterreguliert (Ogawa et al, 1993b).

Um weiterhin den Einfluss von PRMT6 auf die erythroide Genexpression zu untersuchen, wurde die Expression verschiedener erythroider Gene sieben Tage nach Transduktion der K562-Zellen mittels quantitative *real-time* PCR gemessen.

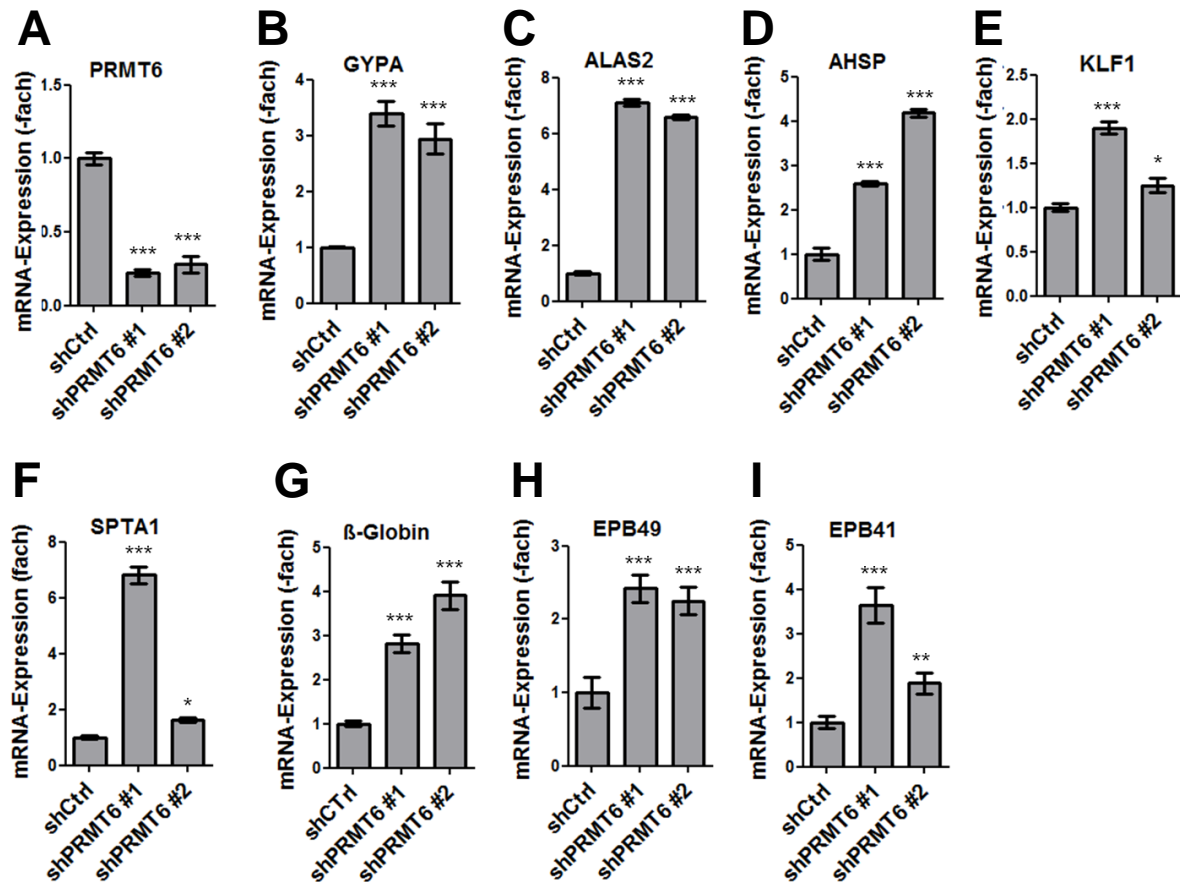


Abbildung 3. 17: Verifizierung der Genexpressionsveränderung erythroider Gene nach PRMT6-Knockdown. K562-Zellen wurden mit zwei verschiedenen shRNA-Konstrukten gegen PRMT6 (shPRMT6#1 und shPRMT6#2) transduziert und die Expression sieben Tage nach Transduktion mittels quantitative *real-time*-PCR gemessen. (A) Der *Knockdown* von PRMT6 konnte validiert und bestätigt werden. (B-I) Die Expression von Genen, die in dem Expressions-Array durch PRMT6-*Knockdown* (siehe Abb. 3. 16 D) reguliert waren, wurden verifiziert. Darunter wurden verschiedene Gene gemessen, wie GYPA (B), ALAS2 (C), AHSP (D), KLF1 (E), SPTA1 (F), β-Globin (G), EPB49 (H) und EPB41 (I). Die Fehlerindikatoren zeigen die Standardabweichung von mindestens vier Bestimmungen und zwei unabhängigen *Knockdown*-Experimenten. Die P-Werte wurden mit Student's t-Test kalkuliert. *P < 0,05, **P < 0,01, ***P < 0,001.

Diese Ergebnisse sind teilweise in der Publikation von Herkt et al (2017) veröffentlicht.

Ebenso wie die *Microarray*-Ergebnisse zeigte der PRMT6-*Knockdown* eine starke Erhöhung der Expression der erythroiden Gene GYPA, ALAS2, AHSP und SPTA1 (Spektrin-alpha-1) (Abbildung 3. 17). SPTA1 ist ein Protein, welches die Plasmamembran mit dem Zytoskelett

verbindet. Es formt schwächere Bindungen als nicht-Erythrozyten-spezifische Spektrine, was die Elastizität und Verformbarkeit der Erythrozyten unterstützt (Gallagher & Forget, 1993; Gallagher et al, 1992). Weiterhin wurde die Expression anderer erythroider Gene gemessen, wie *EPB49* und *EPB41*. Diese Proteine sind ebenfalls mit dem Zytoskelett assoziiert, da sie die mechanische Stabilität und Verformbarkeit durch die Stabilisierung der Spektrin-Aktin-Interaktion in Erythrozyten beeinflussen (Hou et al, 2000; Hung et al, 2000; Khanna et al, 2002; Lalle et al, 2011; Rana et al, 1993). β -Globin und *KLF1*, deren Expression ebenfalls nach PRMT6-Herrunterregulation erhöht vorlag, sind sehr wichtige Proteine, die in der Erythropoese eine große Rolle spielen. β -Globin ist Teil des Hämoglobin-Proteinkomplexes und bildet zusammen mit α -Globin die häufigste Form des adulten Hämoglobins im humanen System (Bunn & Forget, 1986). KLF1 ist ein Transkriptionsfaktor und Masterregulator der Erythropoese und kann als hämatopoetisch-spezifischer Transkriptionsfaktor beschrieben werden, der die Expression von β -Globin und anderen erythroiden Genen erhöhen kann (Kuvardina et al, 2015; Zhou et al, 2010). Des Weiteren ist anzumerken, dass kleine Unterschiede zwischen den unterschiedlichen *Knockdown*-Konstrukten festzustellen sind. Die Effekte der beiden Knockdown-Konstrukte gehen jedoch in die gleiche Richtung, wenn auch die Ausprägung manchmal leicht unterschiedlich ist.

Da die Expression erythroider Gene in der erythroiden Leukämiezelllinie K562 erhöht vorliegt, sollte nun auch die Expression dieser Gene in primären Zellen untersucht werden. Dafür wurden CD34⁺-Zellen mit zwei verschiedenen shPRMT6-Konstrukten transduziert und anschließend in einem Medium kultiviert, welches sowohl die megakaryozytäre, als auch die erythroide Differenzierung erlaubt. Anschließend wurde die Expression verschiedener erythroider Gene mittels quantitativer *real-time* PCR gemessen (siehe Abbildung 3. 18).

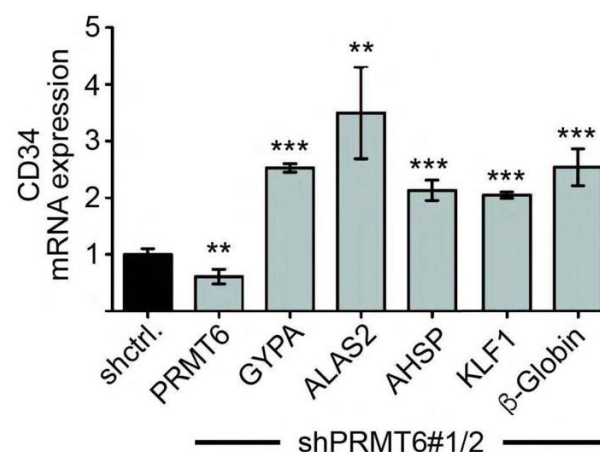


Abbildung 3. 18: Genexpressionsveränderung erythroider Gene nach PRMT6-Knockdown. CD34⁺-Zellen wurden mit zwei verschiedenen shRNA-Konstrukten gegen PRMT6 (shPRMT6#1 und shPRMT6#2) transduziert und in einem Medium kultiviert welches eine megakaryozytäre, als auch eine erythroide Differenzierung zulässt. Anschließend wurde die Expression mittels quantitativer *real-time*-PCR gemessen. Der *Knockdown* von PRMT6

konnte verifiziert werden. Die Expression der erythroiden Gene *GYPA*, *ALAS2*, *AHSP*, *KLF1* und *β -Globin* liegt nach *PRMT6-Knockdown* erhöht vor. Die Fehlerbalken stellen die Standardabweichungen von mindestens 3 Bestimmungen und zwei unabhängigen *Knockdown*-Konstrukten dar. Die P-Werte wurden mit Student's t-Test kalkuliert. **P < 0,01, ***P < 0,001.

Diese Ergebnisse sind in der Publikation von Herkt et al (2017) veröffentlicht.

Es konnte gezeigt werden, dass eine Erhöhung der Expression erythroider Gene auch in CD34+-Zellen mit einer Herunterregulation von PRMT6 erreicht werden konnte (siehe Abbildung 3. 18). Die Expression von *GYPA*, *ALAS2*, *AHSP*, *KLF1* und *β -Globin* erhöht sich im Vergleich zu den Kontrollzellen. Die Expression von PRMT6 verringerte sich im Vergleich zur Kontrolle, was die Wirksamkeit der Herunterregulation durch die sh-Konstrukte bestätigt.

Um zu überprüfen, ob die veränderte Expression von PRMT6 außerdem eine Auswirkung auf die Expression der Oberflächenproteine hat, wurden verschiedene CD-Marker mittels FACS gemessen. Es wurde mit einem Fluoreszenz-gekoppelten Antikörper gegen CD235a (auch Glykophorin A genannt), CD71 und CD41 gefärbt und somit die Expression dieser Marker an der Oberfläche bestimmt. CD71 stellt einen Transferrin-Rezeptor dar, welches die Eisen-Aufnahme von einem Plasma-Glykoprotein vermittelt. CD71 ist stark exprimiert auf unreifen erythroiden Zellen, Plazenta-Gewebe und auf schnell wachsenden Zellen (normale und maligne Zellen) und wird meist als Marker für erythroide Vorläufer genutzt (Dong et al, 2011; Loken et al, 1987a; Loken et al, 1987b; Marsee et al, 2010). CD41 (α IIb-Integrin, Plättchen GPIIb) ist ein Oberflächenprotein der Integrine und wird auf Plättchen und Megakaryozyten exprimiert und kann aus diesem Grund als Marker für Megakaryozyten genutzt werden (Huang & Cantor, 2009; Phillips et al, 1988).

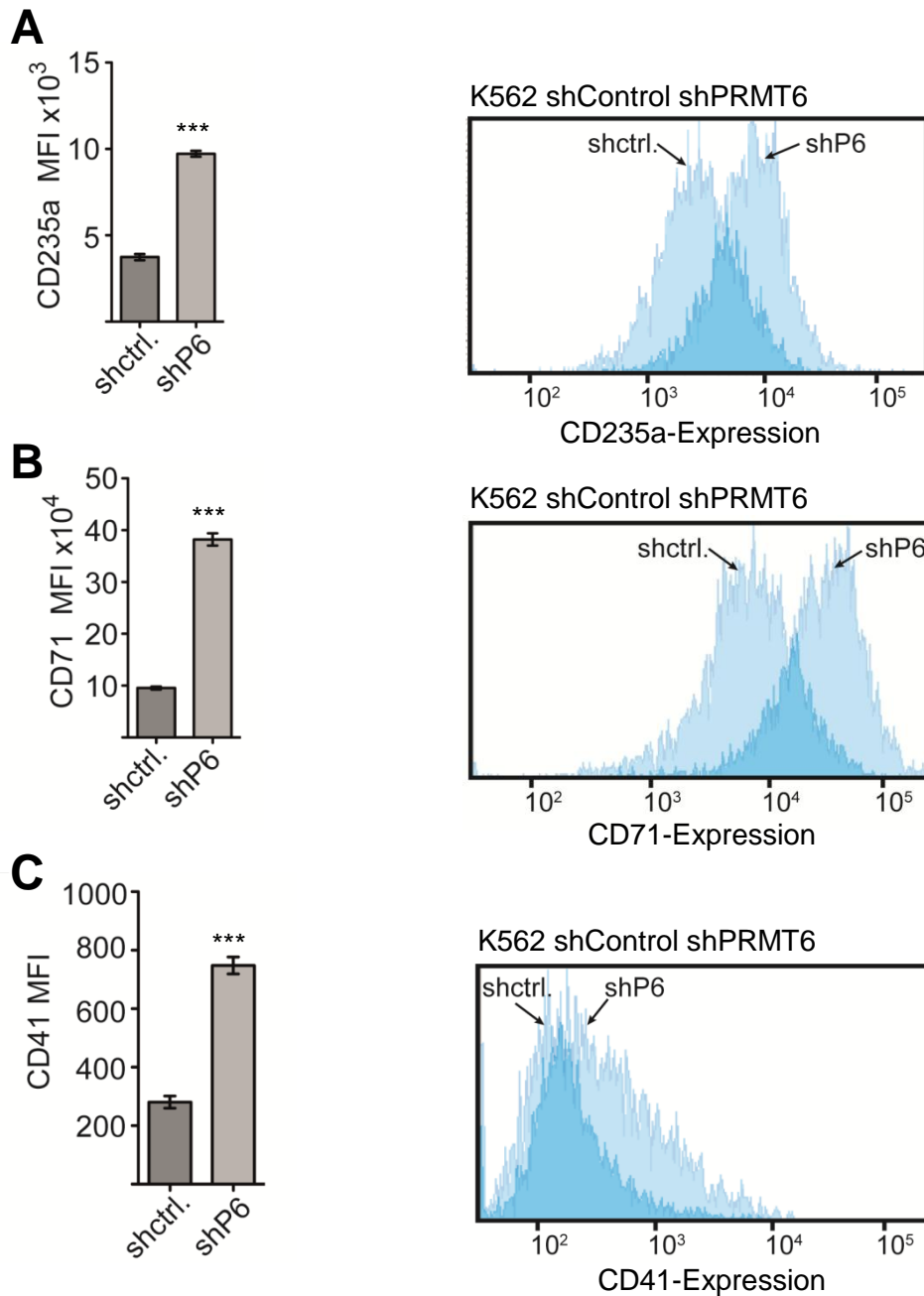


Abbildung 3. 19: Durchflusszytometrische Analyse der Oberflächenexpression in PRMT6-herunterregulierten K562-Zellen. K562-Zellen wurden mit einem *Knockdown*-Konstrukt von PRMT6 (shP6) oder mit dem Kontroll-Konstrukt (shCtrl.) transduziert und die Oberflächenexpression der Marker CD235a (A), CD71 (B) und CD41 (C) sieben Tage nach Transduktion mittels FACS gemessen. Es wird die MFI (mittlere Fluoreszenz-Intensität) links und das dazugehörige Histogramm mit einem Overlay von shControl und shP6 rechts in der Abbildung dargestellt. Die Fehlerbalken stellen die Standardabweichungen von mindestens 3 Bestimmungen dar. Die P-Werte wurden mit Student's t-Test kalkuliert. *** $P < 0,001$.

Diese Ergebnisse sind in der Publikation von Herkt et al (2017) veröffentlicht.

Bei der Messung dieser Marker wird deutlich, dass die Marker für die erythroide Entwicklung, wie CD71 und CD235a sich nach *Knockdown* von PRMT6 stark erhöhen, was auch an der Erhöhung der MFI (mittlere Fluoreszenz-Intensität) zu erkennen ist (Abbildung 3. 19 A und

B). Des Weiteren ist bei den Histogrammen (rechts im Bild) anzumerken, dass eine starke Verschiebung in der MFI der Populationen in Richtung der gesteigerten Oberflächenexpression vorliegt, wenn man Kontroll-Zellen mit den *Knockdown*-Zellen vergleicht (siehe Abbildung 3. 19 A und B rechts). Für den Marker CD41 ist diese Verschiebung der Population nicht so deutlich, wie für die erythroiden Marker, jedoch ist eine Erhöhung der MFI der *Knockdown*-Zellen zu verzeichnen. Somit kann festgestellt werden, dass sich die erythroiden Oberflächenmarker in den *Knockdown*-Zellen erhöhen und der megakaryozytäre Marker nur eine leichte Erhöhung der Oberflächenexpression zeigt.

Zusammenfassend zeigen diese Daten, dass PRMT6 einen repressiven Einfluss auf die erythroide Genexpression hat, welche durch die PRMT6-Herunterregulation veranlasst wird. Insbesondere für Glykophorin A konnte eine Erhöhung der Genexpression und der Oberflächenexpression nach PRMT6-*Knockdown* gezeigt werden. Aus diesem Grund sollte nachfolgend überprüft werden ob *Glykophorin A* ein direktes Zielgen von PRMT6 darstellt.

3.8 *GYPA* ist ein direktes Zielgen von PRMT6

Glykophorin A ist (*GYPA*) ein Membranprotein, welches einen Marker für die erythroide Differenzierung darstellt. Von Lahlil et al, 2004 konnte schon beschrieben werden, dass die Expression von *GYPA* direkt durch die Transkriptionsfaktoren TAL1 und GATA1 kontrolliert wird (Lahlil et al, 2004). Wie in Kapitel 3.6 und 3.7 beschrieben, konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass PRMT6 die erythroide Differenzierung und auch die Expression des erythroiden Markers *GYPA* beeinflusst. Die Analyse von publizierten ChIP-Seq Daten konnte aufzeigen, dass in der Promotorregion von *GYPA* auch funktionelle Bindestellen für RUNX1 zusätzlich zu den TAL1-Bindestellen vorhanden sind (Abbildung 3. 20 A). Für diese beiden Transkriptionsfaktoren ist bekannt, dass sie auch mit PRMT6 assoziiert sind (Kuvardina et al, 2015). Da PRMT6 keine DNA-Bindedomäne hat, muss es durch Transkriptionsfaktoren, als Kofaktor, zu seinen Zielgenen rekrutiert werden. Aus diesem Grund wurde zunächst der *GYPA*-Promotor auf PRMT6-Bindung und Bindung anderer Transkriptionsfaktoren überprüft.

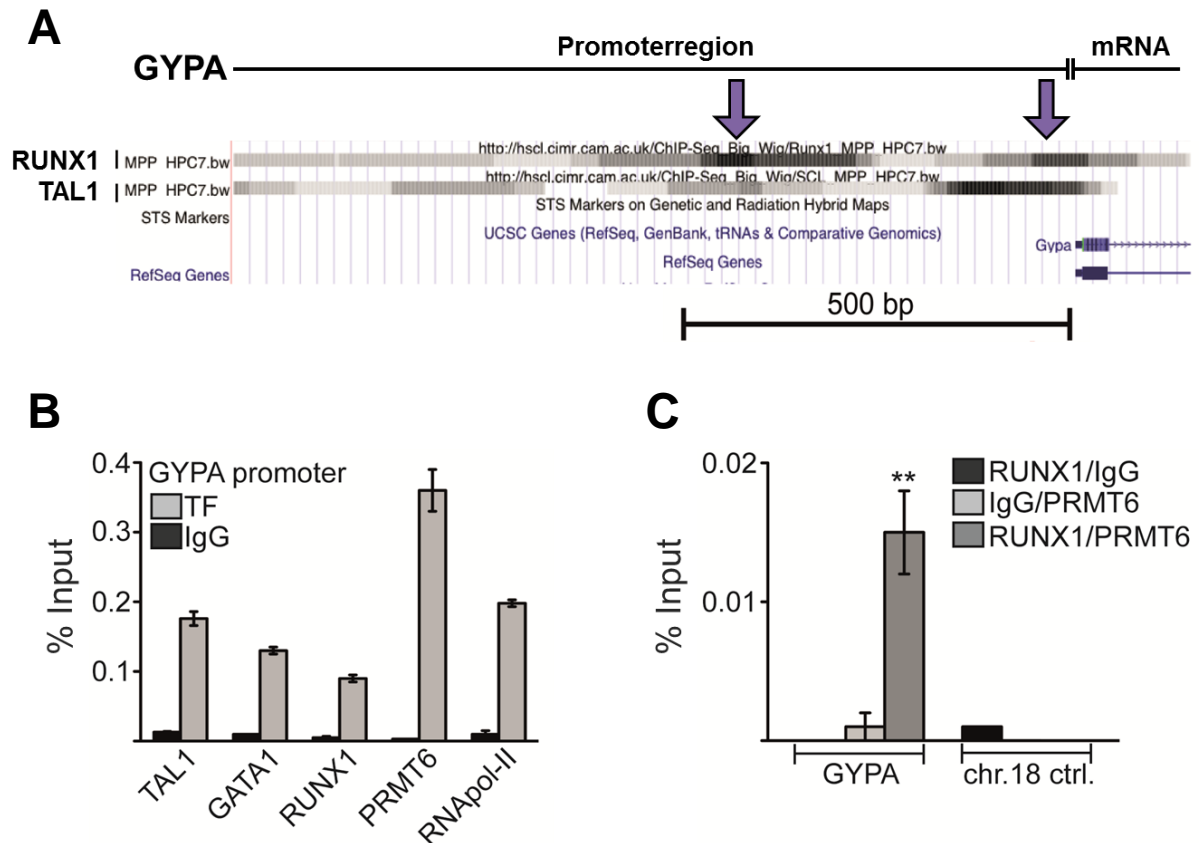


Abbildung 3. 20 : Schematische Darstellung und Besetzung des GYPA-Promotors. (A) Die Analyse von ChIP-Seq-Daten von TAL1 und RUNX1, die mit murinen, pluripotenten Vorläufer-Zelllinie HPC7 durchgeführt wurden, wird schematisch gezeigt (Wilson et al, 2010). Für die Analyse wurde die Software GALAXY genutzt. Eine Anreicherung des Transkriptionsfaktors auf dem Promotor wird als schwarze Fläche dargestellt. Die Pfeile markieren die Bindestellen von RUNX1 und TAL1 auf dem GYPA-Promotor. (B) Die Bindung der Transkriptionsfaktoren Tal1, GATA1 und RUNX1, sowie der Faktoren PRMT6 und der RNA-Polymerase II wurde in K562-Wildtyp-Zellen mit Hilfe eines ChIP-Assays bestimmt. Ein IgG-Antikörper diente in dem ChIP-Assay als Kontrolle, um unspezifisches Binden von Antikörpern zu zeigen. (C) Ein quantitativer ChIP-ReChIP mit RUNX1 und PRMT6 mit verschiedenen Antikörper-Kombinationen zeigte eine Ko-Besetzung von RUNX1 mit PRMT6 auf dem GYPA-Promotor. Hingegen auf der Kontroll-Region Chromosom 18 (Chr 18 ctrl) konnte keine Bindung von RUNX1 zusammen mit PRMT6 detektiert werden. Die P-Werte wurden mit Student's t-Test kalkuliert. **P < 0,01.

Dieser Versuch wurde im Lausen-Labor in Zusammenarbeit mit Olga Lausen durchgeführt. Diese Ergebnisse sind in der Publikation von Herkt et al (2017) veröffentlicht.

Durch eine Chromatin-Immunopräzipitation konnte eine Anreicherung der Transkriptionsfaktoren TAL1, GATA1 und RUNX1 auf dem GYPA-Promotor in K562-Zellen festgestellt werden. Insbesondere konnte jedoch eine Bindung von PRMT6 auf dem Promotor beobachtet werden (Abbildung 3. 20 B). Da Herglotz et al 2011 zeigen konnte, dass RUNX1 dazu fähig ist, PRMT6 zu seinen Zielgenen zu rekrutieren, wurde als nächstes überprüft, ob RUNX1 und PRMT6 zusammen den GYPA-Promotor besetzen. Mit einem sequentiellen ChIP (ChIP-ReChIP-Experiment) konnte gezeigt werden, dass PRMT6 und RUNX1 zusammen auf dem Promotor vorhanden sind. Dies wird durch die Anreicherung von GYPA-Promotor-DNA in dem RUNX1/PRMT6 ChIP-ReChIP deutlich (Abbildung 3. 20 C). In einer Kontroll-Region (Chromosom 18) konnte mit den Antikörpern keine Anreicherung gezeigt werden. Ebenso

die internen IgG-Kontrollen wiesen keine Anreicherung auf. Bei diesen Kontrollen wird erst mit einem RUNX1-gerichteten Antikörper und darauffolgend mit einem IgG-Antikörper präzipitiert oder als erstes mit einem IgG-Antikörper und dann mit einem gegen PRMT6-gerichteten Antikörper, um unspezifisches Binden der Antikörper nicht als positives Signal zu bewerten.

Um weiterhin zu prüfen, ob RUNX1 eine PRMT6-Bindung an den *GYPA*-Promotor vermittelt, wurde ein RUNX1-*Knockdown* in K562-Zellen und anschließend ein ChIP-Assay durchgeführt (siehe Abbildung 3. 21).

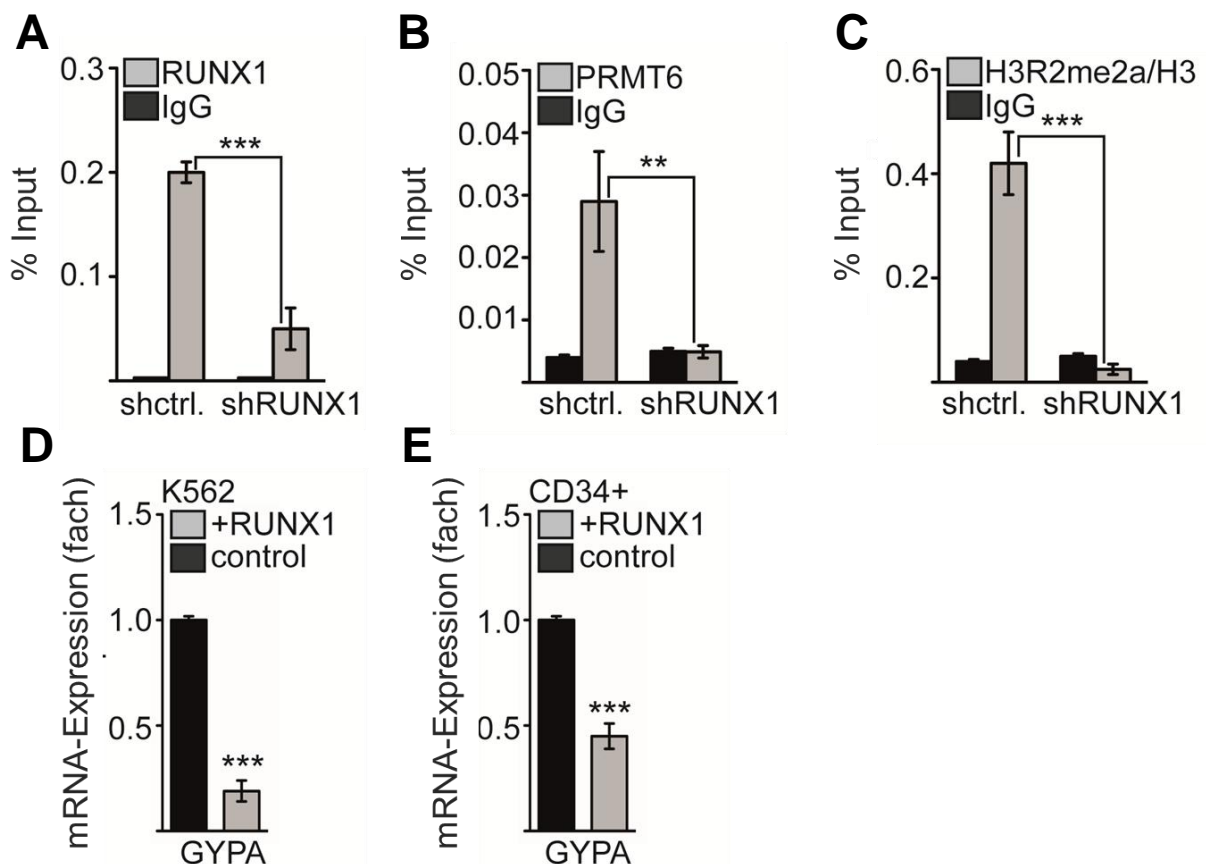


Abbildung 3. 21: Einfluss von RUNX1 auf den *GYPA*-Promotor und die Expression. (A-C) K562-Zellen wurden mit einer shRNA gegen RUNX1 und einer Kontrolle transduziert. Nach der Transduktion wurde die Zellen lysiert und eine Chromatin-Immunopräzipitation mit einem gegen RUNX1 gerichteten Antikörper (A), einem gegen PRMT6 gerichteten Antikörper (B) und einem gegen H3R2me2a Antikörper durchgeführt und die Ergebnisse mittels quantitativer PCR bestimmt. Eine verminderte Bindung von RUNX1 (A) und von PRMT6 (B) konnte auf dem *GYPA*-Promotor detektiert werden. (C) Die Histonmodifikation H3R2me2a liegt reduziert am *GYPA*-Promotor vor, wenn RUNX1 herunterreguliert ist. Die quantitativen ChIP-PCR-Werte werden in Prozent Input dargestellt. Werte für Histonmodifikation, wie für H3R2me2a werden auf einen ChIP gegen unmodifiziertes H3 normalisiert. (D-E) Es wurde die Expression von *GYPA* nach einer lentiviralen Überexpression von RUNX1 in K562 (D) und in CD34+-Zellen (E) mittels qPCR gemessen. Die P-Werte wurden mit Student's t-Test kalkuliert. **P < 0,01, ***P < 0,001.

Dieser Versuch wurde im Lausen-Labor in Zusammenarbeit mit Olga Lausen durchgeführt. Diese Ergebnisse sind in der Publikation von Herkt et al (2017) veröffentlicht.

Die Herunterregulation von RUNX1 führte, wie erwartet, zu einer verminderten RUNX1-Bindung an den *GYPA*-Promotor (Abbildung 3. 21 A). Für PRMT6 konnte ebenfalls eine reduzierte Bindung gezeigt werden, wenn RUNX1 nicht mehr in den Zellen vorhanden war (Abbildung 3. 21 B). Zusätzlich wurde eine Abnahme der Histonmodifikation H3R2me2a, die von PRMT6 vermittelt wird, am *GYPA*-Promotor im Vergleich zu den Kontrollzellen beobachtet (Abbildung 3. 21 C).

Weiterhin resultiert eine Überexpression von RUNX1 sowohl in K562-Zellen, als auch in primären Zellen (hCD34+), in einer reduzierten *GYPA*-Expression (Abbildung 3. 21 D-E). Dies bestätigt weiterhin die Annahme, dass RUNX1 zu der Bindung von PRMT6 auf dem *GYPA*-Promotor beiträgt.

3.9 Epigenetische Veränderungen sind mit der Differenzierung von hämatopoetischen Zellen assoziiert

Die Versuche in Kapitel 3.8 zeigen, dass *GYPA* ein direktes Zielgen von PRMT6 ist. Da *GYPA* ein Differenzierungsmarker für erythroide Zellen darstellt, war es weiterhin interessant zu untersuchen, wie sich die PRMT6- und die RUNX1-Bindung während der Differenzierung von CD34+-Zellen verändert. Dafür wurden zunächst CD34+-Zellen in die megakaryozytäre oder in die erythroide Richtung differenziert.

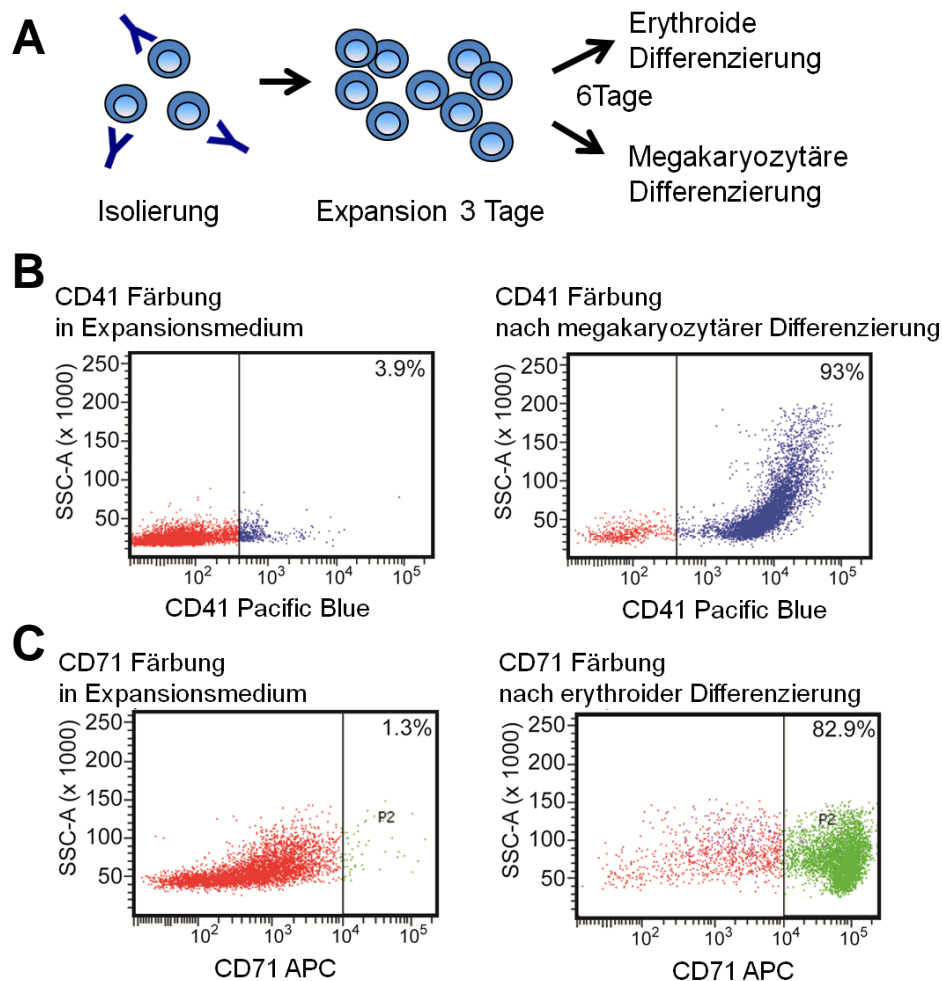


Abbildung 3. 22: Differenzierung von humanen primären CD34⁺-Zellen. (A) Schematische Darstellung der CD34⁺-Differenzierung. Humane CD34⁺-Zellen wurden aus dem Knochenmark oder aus mit G-CSF mobilisiertem peripheren Blut durch magnetische beads isoliert. Nach einer Expansionszeit von 3 Tagen wurde das Medium durch Differenzierungsmedium ausgetauscht. Die erythroide oder megakaryozytäre Differenzierung wurde mit einem Medium, welches EPO oder TPO enthielt, induziert und die Zellen nach 5-7 Tagen gemessen. (B-C) Die Differenzierung der primären Zellen wurde mittels FACS-Analyse mit einem CD41-PacificBlue oder einem CD71-APC Antikörper überprüft. (B) Nach der megakaryozytären Differenzierung wird CD41 verstärkt auf der Oberfläche exprimiert im Vergleich zu den Zellen in Expansionsmedium. (C) Nach der erythroiden Differenzierung mit EPO wird verstärkt CD71 exprimiert im Vergleich zu den undifferenzierten Zellen.

Diese Ergebnisse sind in der Publikation von Herkt et al (2017) veröffentlicht.

Wie in Abbildung 3. 22 dargestellt, konnte eine Differenzierung der CD34⁺-Zellen mit einem Medium, welches TPO enthält, erreicht werden. Die Zusammensetzung der verschiedenen Kulturmedien für die Differenzierung und die Expansion sind in Kapitel 2.4.3 beschrieben (Tabelle 2. 16; Tab. 2. 17; Tab. 2. 18). Während die Kontrollzellen, die im Expansionsmedium verblieben, nur zu 3,9% CD41 auf der Oberfläche exprimierten, konnte in den TPO-behandelten Zellen eine Expression von 93% erreicht werden. Die Differenzierung in die erythroide Richtung war ebenso erfolgreich. Während in den Kontrollzellen nur eine CD71-

Expression von 1,3% gemessen wurde, konnte in den EPO differenzierten Zellen ein CD71-Oberflächenexpression von 82,9% bewirkt werden.

Nachfolgend wurde die Expression von *GYP A* nach megakaryozytärer und erythroider Differenzierung gemessen, da sich diese mit der unterschiedlichen Differenzierung verändern sollte.

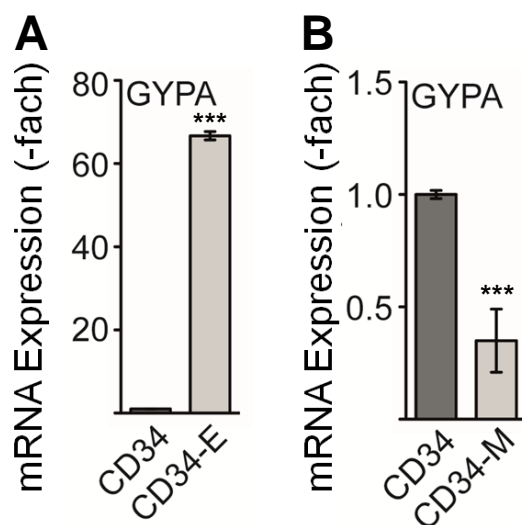


Abbildung 3. 23: Expression von *GYP A* nach erythroider oder megakaryozytärer Differenzierung. Humane CD34+-Zellen wurden in die erythroide (A) oder megakaryozytäre (B) Richtung differenziert und nach 6-7 Tagen die Expression von *GYP A* nach RNA-Isolation mittels qPCR gemessen. Mit erythroider Differenzierung steigt die Expression von *GYP A* während sie sich nach megakaryozytärer Differenzierung im Vergleich zur Kontrolle reduziert. Die Fehlerindikatoren zeigen die Standardabweichung von mindestens vier Bestimmungen. Die P-Werte wurden mit Student's t-Test kalkuliert. ***P < 0,001.

Diese Ergebnisse sind in der Publikation von Herkt et al (2017) veröffentlicht.

Die Glykophorin A-Expression ist nach erythroider Differenzierung hochreguliert, während sie nach megakaryozytärer Differenzierung herunterreguliert wird (Abbildung 3. 23 A und B). Wie in Kapitel 3.7 beschrieben wurde, konnte gezeigt werden, dass PRMT6 mit der Repression von *GYP A* verbunden ist.

Aus diesem Grund sollte untersucht werden, ob PRMT6 mit einer Herunterregulation der *GYP A*-Expression während der megakaryozytären Differenzierung von humanen Vorläuferzellen in Zusammenhang steht.

Dafür wurden humane CD34+-Zellen, wie in Abbildung 3. 22 isoliert und anschließend mit einem Medium, das TPO enthielt, in die megakaryozytäre Richtung differenziert. Anschließend wurde ein ChIP-Assay durchgeführt, um die Bindung von PRMT6 während der megakaryozytären Differenzierung an den *GYP A*-Promotor zu überprüfen. Weiterhin wurde die Bindung von anderen Transkriptionsfaktoren, Kofaktoren und Histonmodifikationen analysiert, um die Besetzung des *GYP A*-Promotors während der megakaryozytären Differenzierung zu verstehen.

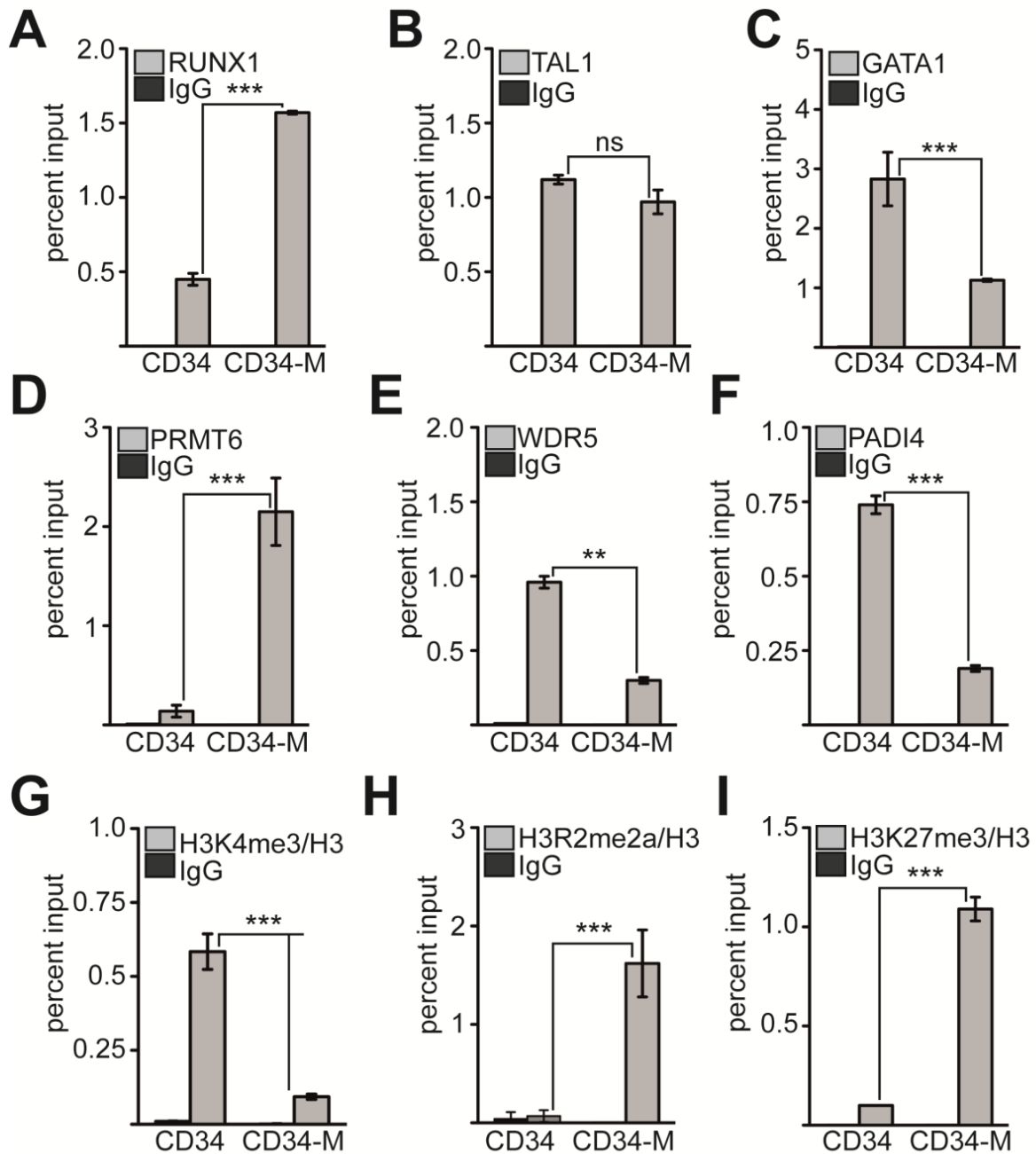


Abbildung 3. 24: Besetzung des GYP A-Promotors nach megakaryozytärer Differenzierung von humanen CD34⁺-Zellen. Die Bindung von verschiedenen Transkriptionsfaktoren (RUNX1, TAL1, GATA1), Kofaktoren (PRMT6, WDR5, PADI4) und Histonmodifikationen (H3, H3K4me3, H3R2me2a, H3K27me3) an den GYP A-Promotor wurden vor und nach megakaryozytärer Differenzierung von primären Zellen (CD34/ CD34-M) mittels ChIP-Assay bestimmt. (A) Die RUNX1-Bindung war erhöht nach megakaryozytärer Differenzierung. (B) Die Tal1-Bindung veränderte sich nicht nach Differenzierung. (C) GATA1-Bindung war verringert durch Differenzierung. (D) PRMT6-Bindung war erhöht nach Differenzierung. (E) WDR5-Bindung war verringert nach megakaryozytärer Differenzierung. (F) PADI4-Bindung war erniedrigt nach Differenzierung. (G) H3K4me3 war verringert nach megakaryozytärer Entwicklung. (H) H3R2me2a war erhöht durch megakaryozytärer Differenzierung. (I) H3K27me3 lag erhöht am GYP A-Promotor nach megakaryozytärer Entwicklung. Die Analyse erfolgte mittels quantitativer *real-time* PCR und wird als Prozent Input angezeigt. Die Werte für Histonmodifikationen, die am Histon H3 stattfinden wurden auf einen ChIP gegen unmodifiziertes H3 normalisiert. Die P-Werte wurden mit Student's t-Test kalkuliert. **P < 0,01, ***P < 0,001. ns=nicht signifikant

Dieser Versuch wurde in Zusammenarbeit mit Julia Herglotz durchgeführt. Diese Ergebnisse sind in der Publikation von Herkt et al (2017) veröffentlicht.

Die RUNX1-Bindung an den *GYP*A-Promotor erhöht sich mit der megakaryozytären Differenzierung von CD34+-Zellen mit TPO, während sich die TAL1-Bindung nicht verändert. Die GATA1-Bindung steigert sich ebenfalls mit megakaryozytärer Differenzierung der primären Zellen. Im Einklang mit der Repressorfunktion von PRMT6 erhöht sich die Bindung von PRMT6 an den *GYP*A-Promotor, wenn die Zellen in Megakaryozyten differenziert werden. Es konnte bereits gezeigt werden, dass eine H3R2me2a, die von PRMT6 vermittelt wird einen negativen Einfluss auf die Bindung von WDR5 hat (Herglotz et al, 2013). Weiterhin wurde gezeigt, dass die Protein-Arginin-Deaminase PADI4, PRMT6 entgegenwirkt. Kolodziej et al. 2014 konnten zeigen, dass PADI4 als ein Aktivator durch entgegenwirken der H3R2me2a-Methylierung von TAL1-Zielgenen wirkt, wie *IL6ST*. Durch megakaryozytäre Differenzierung konnte auch im Rahmen dieser Arbeit von PADI4 am *GYP*A-Promotor festgestellt werden. Gleichmaßen konnte eine Reduktion von WDR5 nach Differenzierung beobachtet werden. Infolgedessen konnte eine Abnahme der aktivierenden Histonmodifikation H3K4me3 und eine Erhöhung der repressiven H3R2-Dimethylierung gezeigt werden, die durch PRMT6 vermittelt wird. Ebenso konnte am *GYP*A-Promotor eine Anreicherung der repressiven Histonmodifikation H3K27me3 gefunden werden. Diese Histonmodifikation ist eine der bekanntesten repressiven Histonmodifikationen und ist stark mit inaktiven Promotoren assoziiert. Sie wirkt im Gegensatz zur aktiven Histonmodifikation H3K4me3, die in dieser Arbeit verringert nach der Differenzierung auf dem Promotor vorlag.

Zusammenfassend konnte gezeigt werden, dass PRMT6 als Repressor auf dem *Glykophorin A*-Promotor während der megakaryozytären Differenzierung wirkt und es zu einer Etablierung eines repressiven Histonmodifikationsmuster kommt.

3.10 Die Manipulation von PRMT6 in CD34+-Zellen hat einen Einfluss auf megakaryozytäre und erythroide Marker

Da gezeigt werden konnte, dass PRMT6 wichtig in der Differenzierung ist und vermutlich eine Rolle in der erythroiden und megakaryozytären Reifung spielt, wurde dies weiterhin mit Hilfe von Differenzierungsversuchen in primären Zellen untersucht.

Dafür wurden zunächst CD34+-Zellen isoliert und entweder mit einem *Knockdown*-Konstrukt oder einem Überexpressionskonstrukt mit der jeweiligen Kontrolle transduziert. Die transduzierten Zellen wurden anschließend in einem Kulturmedium expandiert und dann in ein Differenzierungsmedium überführt, welches eine Differenzierung in die megakaryozytäre und die

erythroide Linie erlaubte. Nach einer Differenzierungszeit von 10-12 Tagen wurde dann zunächst die Expression des erythroiden Markers Glycophorin A auf mRNA-Ebene untersucht.

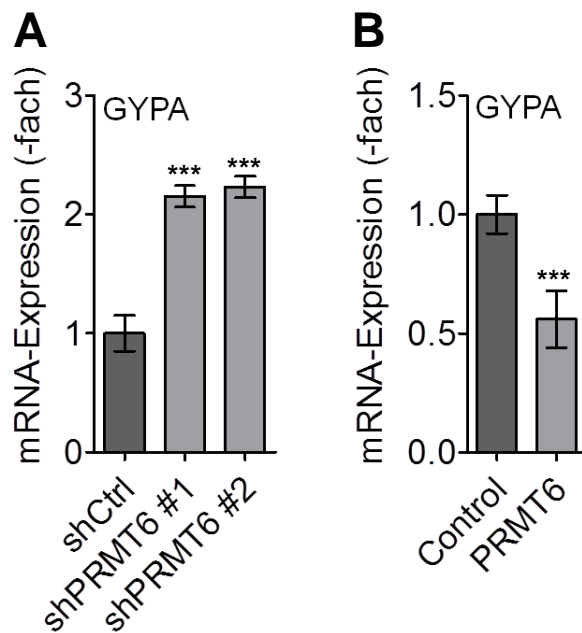


Abbildung 3. 25: GYPA Expressionsveränderung nach PRMT6-Manipulation. CD34+ Zellen wurden isoliert und mit einem *Knockdown*-Konstrukt (shPRMT6) oder einem Überexpressionskonstrukt (PRMT6) und deren jeweiligen Kontrollen (shCtrl, Control) transduziert und anschließend in einem Medium, welches die erythroide oder megakaryozytäre Differenzierung erlaubte, differenziert. Nach 10-12 Tagen wurden die Zellen geerntet und die Expression von GYPA mittels qRT-PCR gemessen. Der *Knockdown* von PRMT6 erhöht die GYPA-Expression, während eine Überexpression den mRNA Level von GYPA erniedrigt. Die Fehlerindikatoren zeigen die Standardabweichung von mindestens vier Bestimmungen und zwei unabhängigen *Knockdown*- bzw. Überexpressions-Experimenten. Die P-Werte wurden mit Student's t-Test kalkuliert. ***P < 0,001.

Die GYPA-Expression verändert sich während der Differenzierung abhängig von PRMT6. Wenn PRMT6 durch eine shRNA herunterreguliert wird erhöht sich die GYPA-Expression, wenn eine megakaryozytäre und erythroide Differenzierung ermöglicht wird (siehe Abbildung 3. 25 A). Wird hingegen PRMT6 überexprimiert erniedrigt sich die GYPA-Expression im Vergleich zu der Kontrolle (Abbildung 3. 25 B). Diese Ergebnisse zeigen, dass PRMT6 während der Differenzierung die Expression eines erythroiden Gens, in diesem Fall Glykophorin A verändern kann.

Es konnte also gezeigt werden, dass sich die Expression von GYPA abhängig von PRMT6 auf mRNA-Ebene verändert. Nachfolgend sollte nun die Oberflächenexpression von GYPA (CD235a), sowie von anderen Differenzierungsmarkern überprüft werden. Dabei wurden CD34+-Zellen, wie zuvor mit einem Konstrukt für *Knockdown* von PRMT6 transduziert und die Zellen in einem Differenzierungsmedium kultiviert, dass eine erythroide und megakaryozytäre Differenzierung erlaubt. Nach einer Differenzierungszeit von 12 Tagen wurden die Differenzierungsmarker GYPA (CD235a), CD71, CD41 und CD61 mittels Fluoreszenzgekoppelter Antikörper im FACS bestimmt. Dadurch konnte untersucht werden, wie sich die Manipulation von PRMT6 auch auf andere Differenzierungsmarker auswirkt.

Tabelle 3. 1: Übersicht der Expression verschiedener Differenzierungsmarker nach PRMT6-Manipulation. Primäre CD34+-Zellen wurden mit einem *Knockdown*-Konstrukt (shPRMT6) und der zugehörigen Kontrolle (Control) transduziert und anschließend in einem Medium, welches die erythroide oder megakaryozytäre Differenzierung erlaubte, differenziert. Nach 12 Tagen wurde die Differenzierungsmarker CD235a, CD71, CD41 und CD61 an der Oberfläche der differenzierten Zellen bestimmt. Die Zahlen entsprechen der mittleren Fluoreszenzintensität (MFI) der gemessenen Zellen.

Konstrukt	CD235a (MFI)	CD71 (MFI)	CD41 (MFI)	CD61 (MFI)
shCtrl	20341,0	40195,0	2134,0	3097,0
shPRMT6	26725,0	45699,0	1026,0	1645,0

Es wurden verschiedene Differenzierungsmarker ausgewählt, CD235a und CD71 für die erythroide und CD41 und CD61 für die megakaryozytäre Differenzierung. Wenn man die mittlere Fluoreszenzintensität der Zellpopulation nach Herunterregulation von PRMT6 mit der Kontrolle vergleicht, kann festgestellt werden, dass sie sich für die erythroiden Marker CD235a und CD71 erhöht, während sie sich für die megakaryozytären Marker erniedrigt (siehe Tabelle 3. 1).

Die gleiche Vorgehensweise wurde ebenfalls mit einem Überexpressionskonstrukt für PRMT6 durchgeführt (siehe Abbildung 3. 26).

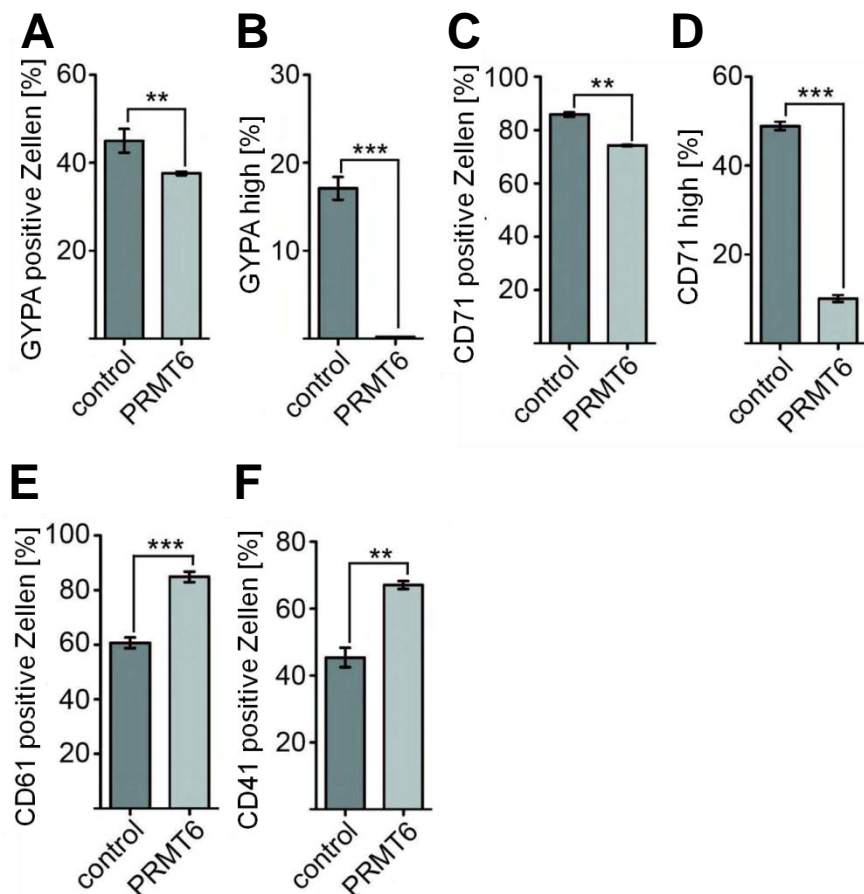


Abbildung 3. 26: PRMT6 Überexpression verändert die Expression erythroider und megakaryozytärer Marker. Humane CD34+-Zellen wurden isoliert und in Expansionsmedium kultiviert. Anschließend wurden die Zellen mit einem PRMT6-Überexpressionvektor und einem Kontrollvektor transduziert und nach zwei Tagen in ein Differenzierungsmedium überführt. Dieses Medium erlaubt eine Differenzierung in die megakaryozytäre, als auch in die erythroide Richtung. Die transduzierten GFP-positiven Zellen wurden nach einer Differenzierungszeit von 10 Tagen im FACS analysiert und die Oberflächenexpression verschiedener Marker gemessen. Die prozentuale Anzahl der GYPA positiven Zellen (A) und der prozentualer Anteil der GYPA high Zellen (B) wurde mittels eines GYPA-Antikörpers in den Proben bestimmt. Die prozentuale Anzahl der CD71 positiven Zellen (C) und die Population die CD71 stark exprimieren (high) (D) wurden ebenfalls bestimmt. Die prozentuale Anzahl der CD61 (E) und CD41 (F) positiven Zellen sind dargestellt. (A-F) Die prozentualen Anteile sind auf die Gesamtzahl der GFP-positiven Zellen bezogen. Die Standardabweichung wurde von vier unabhängigen Bestimmungen berechnet. Die p-Werte wurden mittels Student's t-test ermittelt. **P<0,01; ***P< 0,001.

Diese Ergebnisse sind in der Publikation von Herkt et al (2017) veröffentlicht.

Nach einer Differenzierungszeit von 10 Tagen wurden die verschiedenen Oberflächenmarker mittels FACS gemessen. Die Ergebnisse der Expression der Oberflächenmoleküle sind gegensätzlich zu den *Knockdown*-Versuchen. Bei einer Überexpression kann eine Verminderung in der Anzahl an GYPA-positiven Zellen, sowohl in der Gesamtpopulation, als auch in einer Population, die viel GYPA exprimiert, im Vergleich zu der Kontrolle beobachtet werden. Die Oberflächenexpression des erythroiden Markers CD71 verhält sich ähnlich. Die Gesamtpopulation der CD71-positiven Zellen verringert sich im Vergleich zur Kontrolle signifikant. Dieser Effekt ist in der Population, die viel CD71 exprimieren noch deutlicher zu erkennen. Die Anzahl der für megakaryozytären Marker CD41 und CD61 positiven Zellen hingegen erhöht sich mit der Überexpression von PRMT6 drastisch im Vergleich zur Kontrolle. Zu-

sammenfassend kann festgestellt werden, dass eine PRMT6-Manipulation einen Einfluss auf die erythroide und megakaryozytäre Differenzierung hat und diese in verschiedene Richtungen lenken kann. Die Histogramme der unterschiedlichen Messungen werden exemplarisch jeweils für eine Probe im Anhang (siehe Abbildung 8. 1) dargestellt.

Zusammenfassend konnte nun gezeigt werden, dass auch die Oberflächenexpression von GYPA und auch anderen Differenzierungsmarkern durch PRMT6 beeinflusst werden können.

3.11 Die pharmakologische Inhibition von PRMT6 erhöht die erythroide Genexpression

Es konnte gezeigt werden, dass die Bindung von RUNX1 mit der Repressorfunktion von PRMT6 assoziiert ist. Während der megakaryozytären Differenzierung kann PRMT6 vermehrt auf dem GYPA-Promotor gefunden werden. In der Erythropoese hingegen ist PRMT6 reduziert auf dem Promotor zu detektieren. Weiterhin konnte mit einem CFU-Assay gezeigt werden, dass PRMT6 die Bildung von erythroiden Kolonien erhöht und zusätzlich während der Differenzierung mehr erythroide Marker exprimiert werden.

Aus diesem Grund könnte eine Inhibition der enzymatischen Funktion von PRMT6 eine Möglichkeit darstellen, eine Veränderung in der Differenzierung zu bewirken. Vor kurzem konnten Eram und Kollegen (2016) einen Inhibitor für PRMTs-Typ I entwickeln, der die höchste Spezifität, mit einer IC_{50} von 4 nM, für PRMT6 hat. Dieses *small molecule* inhibiert die PRMT6-Methyltransferase-Aktivität und dadurch die H3R2me2a-Methylierung in HEK293T-Zellen (Eram et al, 2016).

Zunächst wurde der Inhibitor auf K562-Zellen getestet. Dafür wurden die K562-Zellen drei Tage mit verschiedenen Konzentrationen des Inhibitors behandelt und die Expression verschiedener Gene und die Oberflächenexpression von Glycophorin A gemessen.

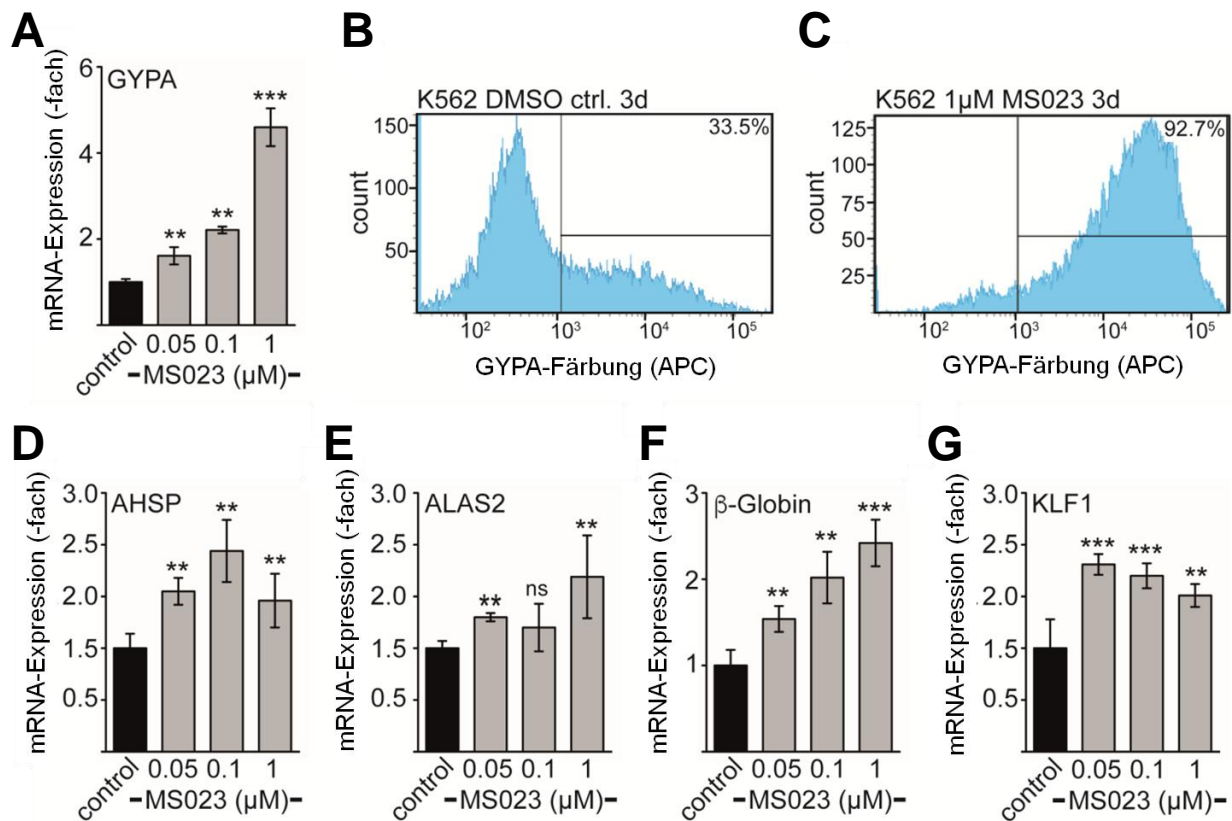


Abbildung 3. 27: Inhibition von PRMT6 in K562-Zellen verändert die Expression erythroider Gene. K562-Zellen wurden drei Tage entweder mit DMSO (control) oder steigenden Konzentrationen (0,05; 0,1; 1 μM MS023) des Inhibitors MS023 behandelt und anschließend die Expression durch qRT-PCR oder die Oberflächenexpression mittels FACS und vorheriger CD-Marker-Färbung gemessen. (A) Die Expression von GYPA erhöht sich mit steigender Konzentration des Inhibitors in K562-Zellen. (B-C) Die GYPA-Expression an der Zelloberfläche der K562-Zellen wurde mit einem anti-CD235a-APC Antikörper bestimmt und die GYPA-Positivität in Prozent gemäß der angezeigten Eingrenzung angegeben. Durch Inhibitor-Behandlung sind mehr K562-Zellen GYPA-positiv. (D-G) Die Expression erythroider Gene *AHSP*, *ALAS2*, *β-Globin* und *KLF1* wurde nach der Inhibitor-Behandlung mittels qRT-PCR gemessen und erhöht sich durch die Inhibitor-Behandlung. Die Standardabweichung wurde von vier unabhängigen Bestimmungen berechnet. Die p-Werte wurden mittels Student's t-test ermittelt. **P<0,01; ***P<0,001.

Diese Ergebnisse sind in der Publikation von Herkt et al (2017) veröffentlicht.

Es konnte gezeigt werden, dass der Inhibitor mit steigender Konzentration, einen steigenden Einfluss auf die GYPA-Expression hat (Abbildung 3. 27 A). Dieses Ergebnis konnte ebenfalls mit einer Oberflächenexpression des GYPA-Markers bestätigt werden. Die GYPA-Expression an der Oberfläche der K562-Zellen konnte mit einer Behandlung von 1 μM MS023 stark erhöht werden. Nach der Behandlung konnte eine Expression von 92,7% Glykophorin A auf der Oberfläche gemessen werden (Abbildung 3. 27 B-C). Weiterhin wurde die Expression mittels qPCR von anderen erythroiden Marker wie *AHSP*, *ALAS2*, *β-Globin* und *KLF1* nach Inhibitor-Behandlung gemessen. Hierbei konnte ebenso eine Erhöhung der Ex-

pression dieser Gene mit steigender Inhibitor-Konzentration verzeichnet werden (Abbildung 3. 27 D-G).

Um zu überprüfen, ob der Inhibitor in K562, wie erwartet, auch eine verminderte H3R2-Dimethylierung zur Folge hat, sollte ein Histon-Western Blot durchgeführt werden.

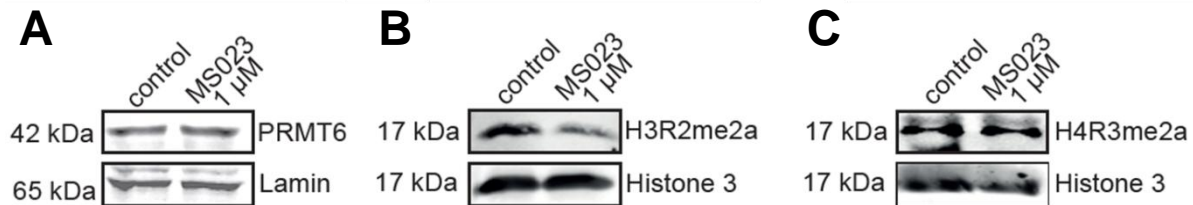


Abbildung 3. 28: Auswirkungen des PRMT6-Inhibitors auf Protein-Ebene. K562-Zellen wurden drei Tage mit 1 µM MS023 behandelt, anschließend geerntet und lysiert. Mittels Western Blot wurde die Protein-Expression von PRMT6 sowie der Methylierungsstatus verschiedener Histone (H3R2me2a, H4R3me2a) untersucht. (A) Western Blot Analyse der PRMT6-Protein-Expression mit Lamin als Ladekontrolle. (B) Western Blot Analyse der H3R2-Dimethylierung mit der dazugehörigen Ladekontrolle Histone 3. (C) Western Blot Analyse der H4R3-Dimethylierung mit der dazugehörigen Ladekontrolle Histone 3.

Diese Ergebnisse sind in der Publikation von Herkt et al (2017) veröffentlicht.

In der Tat konnte eine verminderte H3R2me2 auf dem Blot detektiert werden. Histone 3 blieb als Kontrolle nach Behandlung unverändert (Abbildung 3. 28 B). Außerdem blieb der PRMT6-Protein-Level ebenso von der Inhibitor-Behandlung unbeeinflusst (Abbildung 3. 28 A). Die Spezifität des Inhibitors MS023 wurde mit einem Histon- Western Blot gegen H4R3me2a überprüft. Die Histon-Methylierung H4R3me2a wird vornehmlich durch PRMT1 vermittelt (Wang et al, 2012b). Aus diesem Grund sollte der Inhibitor, wenn er spezifisch ist, keinen Einfluss auf diese Modifikation haben. In Abbildung 3. 28 C ist keine Änderung des H4R3me2a-Protein-Levels nach Inhibitor-Behandlung mit 1 µM MS023 ersichtlich.

Die Daten weisen darauf hin, dass eine PRMT6-Inhibition die erythroide Differenzierung verstärken könnte. Dies sollte nun in primären CD34⁺-Zellen direkt überprüft werden, da diese Zellen differenziert werden können. Dafür wurden die Zellen, wie zuvor erwähnt, in einem Medium kultiviert, welches sowohl eine erythroide, als auch eine megakaryozytäre Differenzierung zulässt und mit verschiedenen Konzentrationen des Inhibitors behandelt. Durch eine FACS-Analyse wurde die Expression verschiedener Differenzierungsmarker analysiert.

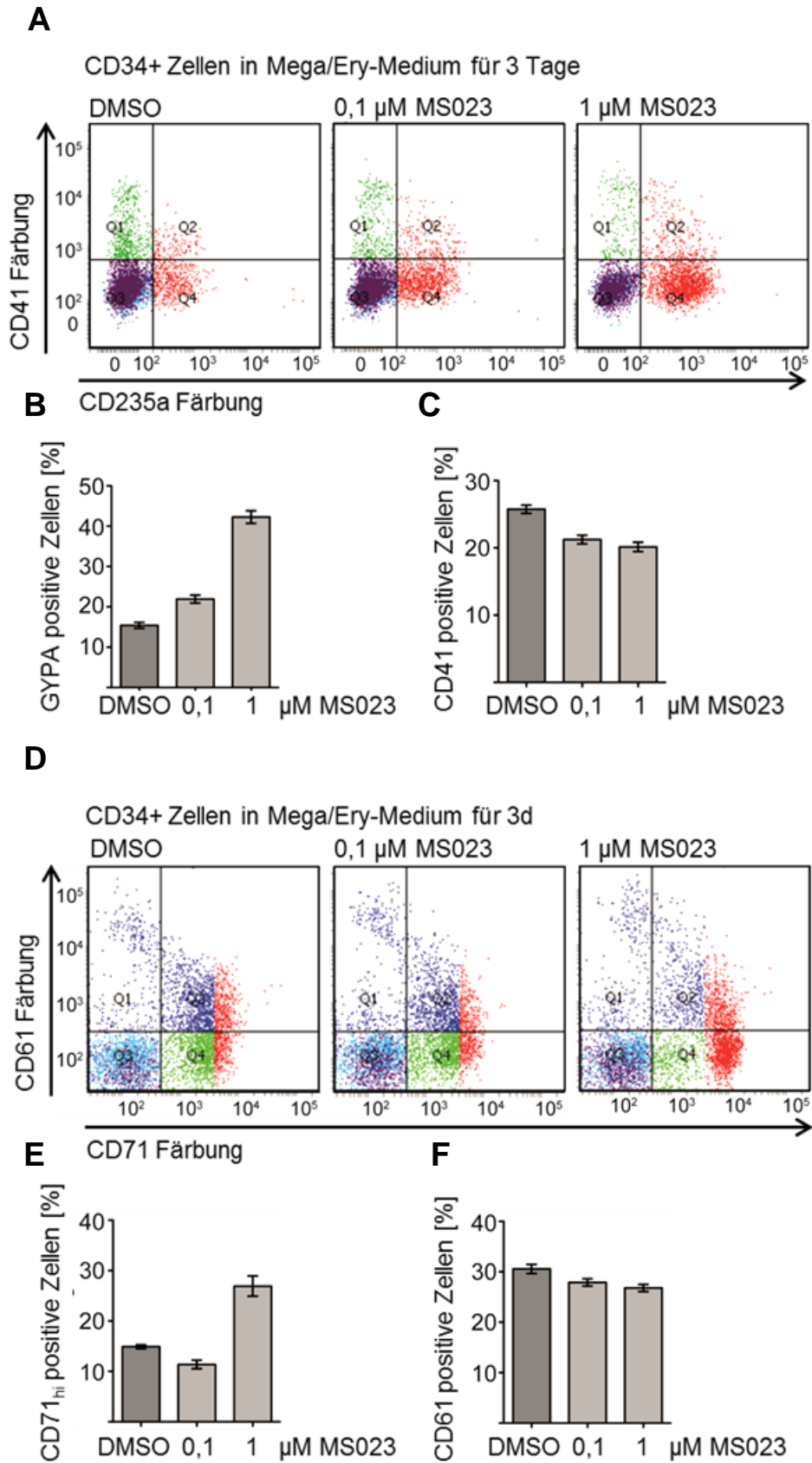


Abbildung 3. 29: Die Inhibition von PRMT6 verstärkt die erythroide Differenzierung in CD34+-Zellen. CD34+-Zellen wurden aus Knochenmark isoliert und anschließend in einem Medium kultiviert, welches eine megakaryozytäre und eine erythroide Differenzierung ermöglicht. Zusätzlich wurden die Zellen mit dem PRMT-Typl-Inhibitor MS023 in den Konzentration 0,1 und 1 μM und mit DMSO als Kontrolle für 3 Tage behandelt. Anschließend wurden im FACS die Differenzierungsmarker GYPA (CD235a), CD41, CD61 und CD71 analysiert. Differenzierte Zellen wurden mit verschiedenen Fluoreszenz-gekoppelten Antikörper gegen CD235a (GYPA), CD41, CD61 und CD71 gefärbt. (A) In der Punktdiagramm-Darstellung der FACS-Messung werden Prozentzahlen der GYPA-positiven (B) oder der CD41-positiven (C) Zellen angezeigt. (D) Punktdiagramm der CD61- und CD71-positiven Zellen. Prozentzahlen der der CD71^{high}- (E) und der CD61-positiven Zellen wird gezeigt.

Diese Ergebnisse sind in der Publikation von Herkt et al (2017) veröffentlicht.

Der Inhibitor wurde in zwei verschiedenen Konzentrationen getestet. Der Oberflächenmarker GYPA (CD235a) erhöht sich schon bei 0,1 μM MS023 von 15% positive Zellen auf 22%. Wenn mit 1 μM Inhibitor behandelt wird, kann eine GYPA-Positivität von etwa 43% erreicht werden (Abbildung 3. 29 A, B). Für CD41 ist eine leichte Verringerung der Oberflächenexpression mit Inhibitor-Behandlung zu erkennen (Abbildung 3. 29 A, C). Die CD61-Expression verändert sich durch den Inhibitor nicht (Abbildung 3. 29 D, F). Des Weiteren wurde der Marker CD71, der eine frühe erythroide Differenzierung kennzeichnet, gemessen. Dabei wurde eine Population detektiert, die CD71 sehr stark exprimiert (CD71_{hi}). Diese Population erhöht sich auf etwa 27%, wenn die CD34+-Zellen mit dem Inhibitor mit einer Konzentration von 1 μM behandelt wird.

Zusammengefasst kann festgestellt werden, dass die Behandlung mit dem Inhibitor die Differenzierung in Richtung der Erythropoese verschiebt, was an der höheren Expression von GYPA (CD235a) und CD71 zu erkennen ist.

Da eine Verschiebung der Differenzierung in Richtung Erythropoese gemessen werden konnte, wurde nun die Expression anderer erythroider Gene in CD34+-Zellen gemessen.

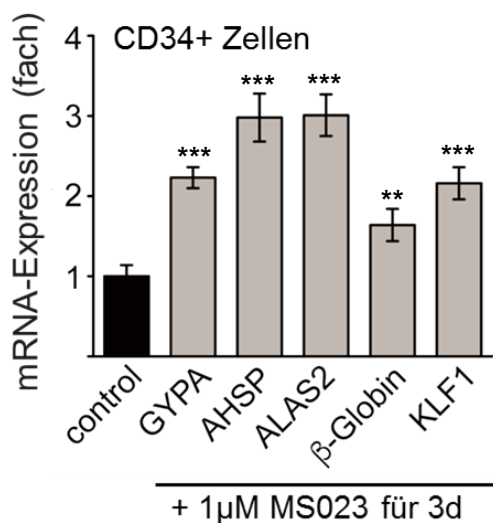


Abbildung 3. 30: Inhibition von PRMT6 in CD34+-Zellen verändert die Expression erythroider Gene.

CD34+ -Zellen wurden aus humanem Knochenmark isoliert und anschließend in einem Medium kultiviert, welches eine megakaryozytäre und eine erythroide Differenzierung ermöglicht. Zusätzlich wurden die Zellen mit 1 μM des PRMT-Typl-Inhibitors MS023 oder mit DMSO als Kontrolle für drei Tage behandelt. Anschließend wurden die Expression der erythroiden Gene *GYPA*, *AHSP*, *ALAS2*, *β-Globin* und *KLF1* mittels qPCR gemessen. Nach Inhibitor-Behandlung konnte eine Erhöhung aller erythroiden Gene im Vergleich zu der Kontrolle (control), die mit DMSO behandelt wurde, erreicht werden. Die Fehlerindikatoren zeigen die Standardabweichung von mindestens vier Bestimmungen und zwei unabhängigen Inhibitor-Behandlungen. Die P-Werte wurden mit Student's t-Test kalkuliert. **P<0,01; ***P < 0,001.

Diese Ergebnisse sind in der Publikation von Herkt et al (2017) veröffentlicht.

Durch eine Behandlung mit dem Inhibitor MS023 für drei Tage konnte eine Erhöhung der Expression von erythroiden Genen, wie *GYPA*, *AHSP*, *ALAS2*, β -Globin und *KLF1* in CD34+-Zellen erreicht werden (Abb. 3. 30). Das bedeutet, nach Inhibitor-Behandlung werden in CD34+-Zellen, PRMT6-assoziierte erythroide Gene stärker exprimiert, ähnlich wie in den K562-Zellen.

Weiterhin sollte überprüft werden, ob auch durch die Inhibitor-Behandlung Veränderungen auf dem *GYPA*-Promotor und auch die gesamte Differenzierung im CFU-Assay verändert wird.

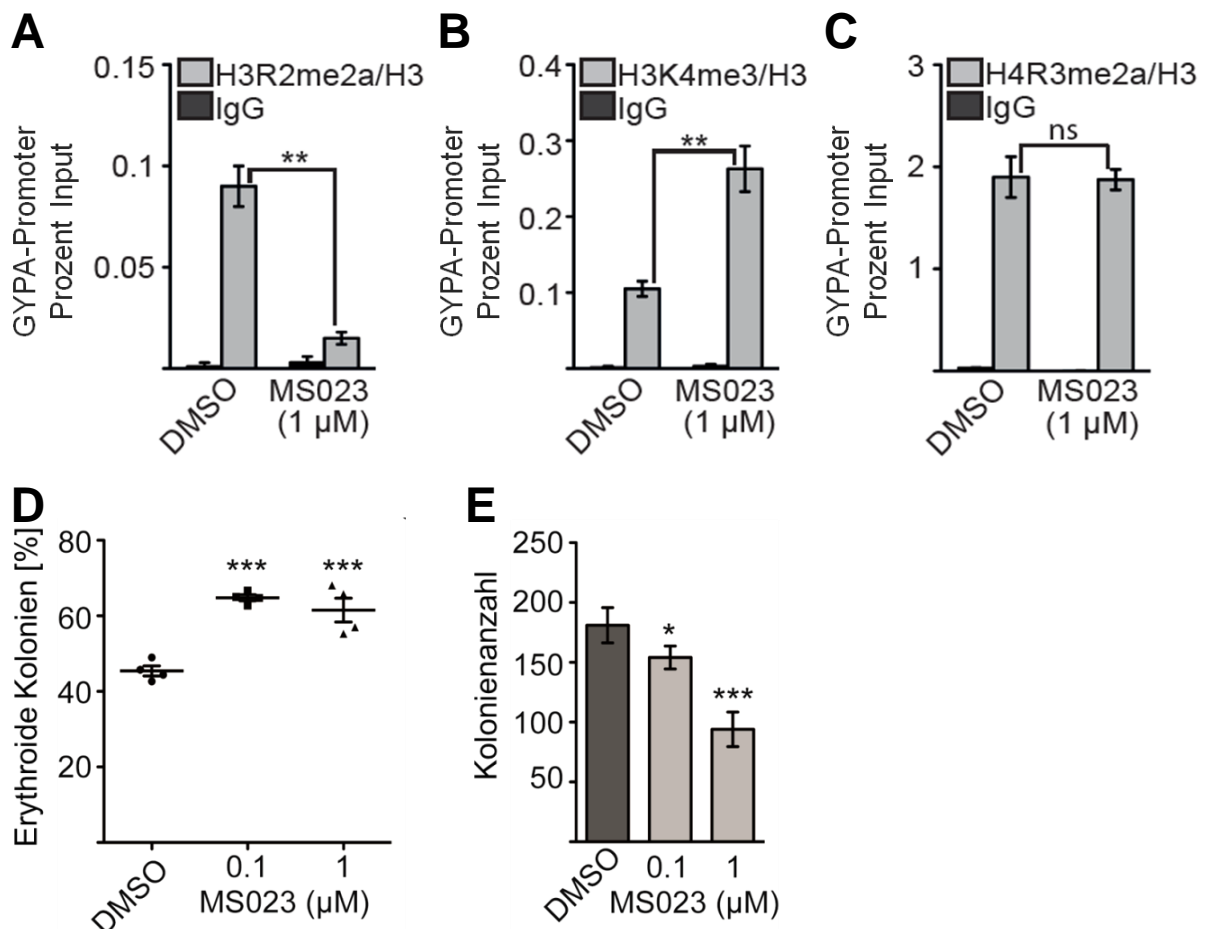


Abbildung 3. 31: Veränderungen des *GYPA*-Promotor-Status und der Differenzierung nach Inhibitor-Behandlung. (A-C) Humane CD34+-Zellen wurden in einem Medium, welches sowohl eine erythroide, als auch eine megakaryozytäre Differenzierung erlaubt, kultiviert und mit 1 µM MS023 behandelt. Anschließend wurde ein ChIP-Assay mit verschiedenen Histon-Antikörpern (Antikörper gerichtet gegen H3R2me2a, H3K4me3, H4R3me2a und H3) durchgeführt. Als Ergebnis werden quantitative *real-time* PCR- Werte von ChIP-Experimenten als Prozent Input gezeigt. Werte für die Histonmodifikationen, die am Histon H3 stattfinden wurden auf einen ChIP gegen unmodifiziertes H3 normalisiert. (A) H3R2me2a ist nach Inhibitor-Behandlung verringert auf dem Promotor. (B) H3K4me3 kann verstärkt auf dem Promotor nach Inhibitor-Behandlung gefunden werden. (C) H4R3me2a verändert sich nach Inhibitor-Behandlung nicht. (D-E) humane CD34+-Zellen wurden isoliert und in Methylcellulose ausgesät, dass entweder mit DMSO; 0,1 µM oder 1 µM des Inhibitors MS023 versetzt wurde. Nach 10-12 Tagen wurden die verschiedenen Kolonien ausgezählt. (D) Die prozentualen Anteile der erythroiden Kolonien an der Gesamtkolonienanzahl nach verschiedenen Behandlungen sind dargestellt. Die erythroiden Kolonien erhöhen sich mit beiden Konzentrationen des Inhibitors im Vergleich zur Kontrolle. (E) Darstellung der absoluten Kolonienanzahlen mit den verschiedenen Behandlungen. Eine Behandlung mit MS023 mit führt zu

einer Verringerung der Gesamtkolonienanzahl. Die P-Werte wurden mit Student's t-Test kalkuliert. *P < 0,05, **P < 0,01, ***P < 0,001. ns=nicht signifikant

Diese Ergebnisse sind in der Publikation von Herkt et al (2017) veröffentlicht.

Durch eine Inhibitor-Behandlung mit 1 μ M MS023 konnte eine Verringerung der reprimierenden Histonmodifikation H3R2me2a im Vergleich zur Kontrolle in CD34+-Zellen erreicht werden (Abbildung 3. 31 A). Weiterhin konnte eine Erhöhung der aktivierenden Histonmodifikation H3K4me3 auf dem *GYP*A-Promotor identifiziert werden (Abbildung 3. 31 B). Keine Veränderung der Dimethylierung von H4R3 wurde hingegen nach Inhibitor-Behandlung in CD34+-Zellen detektiert (Abbildung 3. 31 C).

Außerdem wurde die Differenzierung der CD34+-Zellen mit Inhibitor-Behandlung mit einem CFU-Assay überprüft (Abbildung 3. 31 D-E). Dabei konnte eine Erhöhung der prozentualen Anteile der erythroiden Kolonien an der Gesamtkolonienanzahl festgestellt werden (Abbildung 3. 31 D). Weiterhin wurde eine Verringerung der Gesamtkolonienanzahl erfasst, die mit steigender Inhibitor-Konzentration verstärkt wird.

Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass durch eine Inhibition von PRMT6 durch MS023 die Erythropoese während der Differenzierung von Vorläuferzellen verstärkt wird und außerdem die Expression erythroider Marker in K562 verändert werden kann.

4 Diskussion

4.1 PRMT6 als mögliches Ziel einer Therapie

Chromatin-modifizierende Enzyme haben sich als potentielle Ziele für eine Krebstherapie herausgestellt. Epigenetische Enzyme sind attraktive Zielstrukturen für eine Therapie, da sie durch ihre enzymatische Aktivität die Genexpression modulieren können (Durst & Hiebert, 2004). Inhibitoren für Histon-Deacetyltransferasen konnten bereits erfolgreich in der Klinik getestet werden (Furumai et al, 2002; Wagner et al, 2010; Warrell et al, 1998).

Außerdem stellen ebenfalls Protein-Arginin-Methyltransferasen mögliche Ziele für eine epigenetische Therapie dar. Sie katalysieren die Mono- oder Dimethylierung der Arginin-Reste von Histonen, aber auch von nicht-Histon-Substraten, wie Transkriptionsfaktoren. Durch die Methylierung von Histonresten können sie die Expression von Genen regulieren und dadurch verschiedene biologische Prozesse, wie Transkription, DNA-Reparatur, RNA-Prozessierung und Translation, beeinflussen (Greenblatt et al, 2016). Die Arginin-Methylierung ist eine häufige posttranslationale Modifikation in Säugerzellen und in vielen Regulationsmechanismen involviert. Eine Misregulation und eine aberrante Expression der Protein-Arginin-Methyltransferasen sind mit verschiedenen Krankheiten und insbesondere mit Krebs assoziiert. Mehrere Studien weisen auf eine vielseitige Rolle der PRMT-Dysregulation in der Krankheitsentwicklung hin. Krankheiten, die mit PRMTs assoziiert sind, sind zum Beispiel: Virus-Krankheiten (Alinari et al, 2015; Jeong et al, 2006; Xie et al, 2007), eine dysregulierte inflammatorische Immunantwort (Bandyopadhyay et al, 2012; Sun et al, 2015), kardiovaskuläre Krankheiten (Bouras et al, 2013; Teerlink et al, 2009), Nierenkrankheiten (Cvetković et al, 2012; Raptis et al, 2013), Diabetes (Krzyzanowska et al, 2008), Lungenkrankheiten (Zakrzewicz et al, 2012) und die Krebsentwicklung (Cha & Jho, 2012; Di Lorenzo & Bedford, 2011; Nicholson et al, 2009; Park et al, 2015; Scoumanne & Chen, 2008; Teyssier et al, 2010; Yang & Bedford, 2013; Zheng et al, 2008). So konnte insbesondere gezeigt werden, dass PRMTs mit der Progression von Krebs verknüpft sind. Dabei wurden einige Mitglieder identifiziert, die in der akuten myeloischen Leukämie überexprimiert sind, wie PRMT4 und PRMT5 (Jansson et al, 2008; Liu et al, 2011; Zhao et al, 2009). Für PRMT4 konnte beispielsweise festgestellt werden, dass es die myeloide Differenzierung inhibiert, durch die Bildung eines repressiven RUNX1-Komplexes. Die Herunterregulation von PRMT4 in verschiedenen humanen Leukämie-Zelllinien und in humanen CD34⁺-Zellen verstärkte die myeloide Differenzierung (Vu et al, 2013). So werden *small molecules* immer relevanter für eine Krebstherapie und sind Ziel der aktuellen Forschung. Insbesondere für PRMT6 konnte noch

kein Zusammenhang mit der akuten myeloischen Leukämie hergestellt werden. In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass auch PRMT6 in der akuten myeloischen Leukämie als Ziel einer möglichen Therapie fungieren könnte.

4.1.1 PRMT6 beeinflusst das Wachstum

Um zu überprüfen, ob eine Herunterregulation von PRMT6 einen wachstumsinhibierenden Effekt in Leukämiezelllinien hat, wurden für diese Arbeit verschiedene Experimente durchgeführt. Es konnte mittels einer Wachstumskurve (Abbildung 3. 1), als auch einem Xenograft-Experiment in Nod/Scid-Mäusen (Abbildung 3. 2) dargestellt werden, dass der *Knockdown* von PRMT6 zu einem verringerten Wachstum der Leukämiezelllinie K562 führt. Dabei konnte eindeutig gezeigt werden, dass durch den *Knockdown* von PRMT6 im Vergleich zu den Kontrollzellen die Wachstumskurve stark beeinflusst wird und im Xenograft-Experiment keine Tumore bzw. nur kleine Tumore gebildet werden konnten. Dieser wachstumsinhibierende Effekt konnte ebenso in einem CFU-Assay mit primären Zellen, CD34+-Zellen, herausgearbeitet werden (Abbildung 3. 3 A). Ähnliche Effekte konnten bis jetzt auch in Osteosarkomazellen, U2OS-Zellen, gezeigt werden. Stein und Kollegen (2012) erreichten durch eine Depletion von PRMT6 eine Inhibition der Koloniebildung im Vergleich zu den Kontrollzellen. Dies zeigt, dass eine PRMT6-Depletion die Proliferationsfähigkeit der Zellen begrenzt (Stein et al, 2012). Weiterhin wurde von einer anderen Gruppe beschrieben, dass ein lentiviraler *Knockdown* von PRMT6 in Brustkrebszelllinien (MCF7, MDA-MB-231) das Wachstum inhibiert und spezifisch zu einer Reduktion von Zellen in der S-Phase führt (Phalke et al, 2012). Für diese Brustkrebszellen hat die Gruppe um Phalke, ähnlich wie in dieser Arbeit, ein Xenograft-Experiment durchgeführt, um die Effekte *in vivo* zu testen. Dabei konnten sie ebenfalls keine Tumorbildung in den Mäusen finden, in denen die *Knockdown*-Zellen injiziert wurden (Phalke et al, 2012).

Mit der vorliegenden Arbeit konnte erstmalig gezeigt werden, dass PRMT6 auch das Wachstum von Leukämiezelllinien beeinflusst. Weiterführend könnten diese Experimente auch mit anderen Leukämiezelllinien durchgeführt werden, um diesen Effekt weiterhin zu bestätigen. Jedoch wären Zellen von Patienten mit akuter Leukämie besonders interessant zu testen, da dieses Primärmaterial nicht so vielen substantiellen Veränderungen, wie Zellkulturanpassungen, untersteht wie eine Krebszelllinie. Dabei könnten die Zellen von Patienten in Kultur genommen, mit PRMT6-*Knockdown*- und Kontroll-Konstrukten transduziert und anschließend eine Wachstumskurve durchgeführt werden, um einen Effekt von PRMT6 in primären Zellen zu untersuchen. Da in dieser Arbeit ein wachstumsinhibierender Effekt in einem CFU-Assay

in primären Zellen gezeigt werden konnte, weist dies darauf hin, dass eine Inhibition von PRMT6 nicht nur in stark veränderten Krebszelllinien einen Effekt hat. In den CD34+-Zellen wurde weiterhin untersucht, ob eine Überexpression einen positiven Einfluss auf die Koloniebildung hat. Dies konnte nicht bestätigt werden, da keine Veränderung der Kolonieanzahlen im Vergleich zu der Kontrolle stattgefunden hat. Es kann vermutet werden, dass eine Überexpression von PRMT6 nicht ausreicht, um eine Proliferationsvermehrung zu erreichen. Weiterhin ist anzumerken, dass eine Überexpression eines Proteins in Zellen ein sehr artifizielles System darstellt, da das Protein in den Zellen in sehr großen, nicht physiologischen Mengen vorliegt und dies zu einer starken Beeinträchtigung und Beeinflussung anderer biologischer Mechanismen führen kann (Prelich, 2012). Es könnte jedoch auch zutreffen, dass PRMT6 noch weitere Koregulatoren benötigt, um einen wachstumsanregenden Effekt auf die Zellen zu haben. Für abschließende Verifizierung könnte eine Überexpression von PRMT6 in weiteren Zelllinien durchgeführt werden. Hingegen konnte von einer anderen Gruppe gezeigt werden, dass eine Überexpression von PRMT6 in einem speziellen Zellmodell zu einer reduzierten Seneszenz führt (Stein et al, 2012). In diesem artifiziellen Zellmodell mit einer onkogen-induzierbaren Seneszenz (OIS), gilt p21 als Aktivator des Seneszenz-Phänotyps und wird durch eine Überexpression von PRMT6 inhibiert. So könnte in weiteren Wachstums-Versuchen auch der Effekt von einer PRMT6-Überexpression auf die Seneszenz in anderen Zellen als CD34+-Zellen untersucht werden. Eine weitere Bestätigung des Zusammenhangs mit der Seneszenz und dem Einfluss von PRMT6 auf das Wachstum zeigt der Phänotyp des *Knockout*-Modells von PRMT6. Die *Knockout*-Maus von PRMT6 ist zwar lebensfähig, die murinen embryonischen Fibroblasten (MEFs) dieser Embryonen gehen jedoch in eine schnelle zelluläre Seneszenz und sind in ihrem Wachstum beeinträchtigt (Neault et al, 2012).

4.1.2 PRMT6 ist in AML-Patienten-Proben exprimiert

Es ist schon viel über die Beteiligung von PRMTs in der Tumorigenese bekannt. Eine erhöhte PRMT-Expression ist mit aggressiven klinischen Befunden und schlechter Überlebensprognose von Patienten assoziiert (Yang & Bedford, 2013; Yoshimatsu et al, 2011). Es konnte zum Beispiel gezeigt werden, dass eine Überexpression von PRMT1 das Überleben und die Infiltration von Krebszellen verstärkt, während ein *Knockdown* von PRMT1 in einem Zellzyklusarrest resultiert (Baldwin et al, 2012; Liao et al, 2015; Mathioudaki et al, 2008; Papadokostopoulou et al, 2009; Wei et al, 2014). So wurde eine Überexpression von PRMTs in verschiedenen Krebsarten schon festgestellt. Speziell für PRMT6 wurde gezeigt, dass es in Brust-, Blasen-, Prostata-, Lungenkrebs und in Lymphomen überexprimiert ist. Ein eindeu-

tiger Zusammenhang mit einer Leukämie-Entstehung wurde noch nicht eindeutig beschrieben. In dieser Arbeit wurden Knochenmarkstanzen von 83 AML-Patienten ausgewertet und es konnte gezeigt werden, dass die durchschnittliche Expression der AML-Patienten bei etwa 60% PRMT6-positiver Zellen liegt. Die Expression von PRMT6 in gesunden Spendern lag bei etwa 25%, wobei die Stichprobenanzahl nur bei 4 lag. Somit kann in dieser Arbeit erstmalig gezeigt werden, dass im Vergleich zu nicht erkrankten Probanden PRMT6 in AML-Patienten verstärkt exprimiert wird. Es konnte eine Verbindung mit der akuten myeloischen Leukämie hergestellt werden. Zuvor konnten Phalke und Kollegen zeigen, dass PRMT6 auch in Brustkrebsproben überexprimiert ist. Diese Gruppe konnte in Gewebeproben von Krebspatienten eine Expression von 54,1% zeigen, während in normalem Gewebe nur eine Expression von PRMT6 von 43,9% vorlag (Phalke et al, 2012). Der Unterschied der getesteten AML-Knochenmarkproben zu den Kontrollproben war in dieser Arbeit sogar noch gravierender. Genauer beschrieben haben mehr AML-Patienten eine starke Expression (>60%) und mittlere Expression von PRMT6 als eine schwache Expression, die bei weniger als 25% lag.

Weiterhin wurde in der vorliegenden Arbeit auf eine Korrelation der PRMT6-Expression und dem Geschlecht der Probanden untersucht. Schon in anderen Arbeiten konnte gezeigt werden, dass ein geschlechtsspezifischer Unterschied in der Expression von manchen Proteinen vorliegt. Es konnte gezeigt werden, dass die Expression von BRCP1 (*breast cancer resistance protein 1*) in der Leber in Männern höher war als in Frauen, sich in anderen Geweben jedoch nicht unterschied. So macht eine geschlechtsabhängige Expression dieses Proteins in der Leber einen geschlechtsspezifischen Unterschied im Umgang mit Substraten (Merino et al, 2005). In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass die PRMT6-Expression im Mittel bei Männern im Knochenmark leicht höher als in der Gruppe der Frauen war. Jedoch, wie zuvor in den Ergebnissen erwähnt, liegt dieser Unterschied an der Signifikanzgrenze und müsste durch die Testung von weiteren Proben eindeutig bewiesen werden. Eine andere Forschergruppe konnte hingegen keinen geschlechtsspezifischen Unterschied in der Expression von PRMTs zeigen. Hier war keine erhöhte Expression von PRMT1 mit dem Geschlecht assoziiert, jedoch korrelierte sie mit dem Schweregrad einer Asthma-Diagnose (Sun et al, 2017). Insgesamt sollten im Falle der Korrelation der PRMT6-Expression mit dem Geschlecht weitere Knochenmarkproben analysiert werden, um diesen Effekt zu bestätigen. Interessanterweise wurde von dem amerikanischen Krebs-Verbund (American Cancer Society) bestätigt, dass das Auftreten einer AML ein wenig höher in Männern als in Frauen ist (American Cancer Society, 2017). Ob dieser geschlechtsspezifischer Unterschied vielleicht mit dem geschlechtsspezifischen Unterschied in der PRMT6-Expression korreliert, bleibt unklar und müsste noch bewiesen werden.

Bei dem Zusammenhang der PRMT6-Expression und des Subtyps der AML konnte kein signifikanter Unterschied unter den Proben festgestellt werden. Die FAB-Subtypen M0 bis M5 beginnen alle mit einer unreifen Form der weißen Blutkörperchen, während der FAB-Subtyp M6 durch eine unreife Form der roten Blutkörperchen charakterisiert ist, bei der man auch von einer Erythroleukämie sprechen kann. Der FAB-Subtyp M6 hatte hierbei im Mittel die geringste PRMT6-Expression und M5 die höchste. Hierbei handelt es sich um die akute monozytische Leukämie, bei der die häufigsten Blutzelltypen (80%) Monozyten und Monoblasten darstellen. Für PRMT1 konnte eine Verbindung zu der Leukämie, bei der das Fusionsprotein AML-ETO eine Rolle spielt, gezeigt werden. PRMT1 interagiert mit AML1-ETO, welches ein Hauptfaktor der Leukämieentstehung darstellt und in 15% der akuten myeloidischen Leukämie vorkommt. PRMT1 interagiert und methyliert AML1-ETO und verstärkt dadurch seine transkriptionelle Aktivität, sowie seine Selbsterneuerungsfähigkeit (Shia et al, 2012). Die Translokation t(8;21) bei der AML-ETO entsteht ist mit dem FAB-Subtyp M2 assoziiert. Dass PRMT6 mit einem speziellen FAB-Subtyp assoziiert ist konnte hier nicht festgestellt werden.

Zusammenfassend konnte in dieser Arbeit ein Bezug zur Leukämie hergestellt werden, da PRMT6 in AML-Patienten überexprimiert zu sein scheint, was bis dato nur für PRMT1 oder PRMT5 gezeigt werden konnte (Shia et al, 2012; Wang et al, 2008; Yoshimatsu et al, 2011). Somit stellen PRMTs ein wichtiges Ziel für eine potentielle Leukämie-Therapie dar und molekulare Inhibitoren könnten eingesetzt werden, um neue Therapien gegen eine Leukämie zu etablieren. Um weiterhin zu testen, ob PRMT6 zur Leukämie-Entstehung beiträgt, könnte ein PRMT6-Überexpressionsexperiment in einem Mausmodell mit einem Leukämie-Hintergrund durchgeführt werden. Durch die zusätzliche Expression von PRMT6 könnte die Leukämie-Entstehung begünstigt und die Auswirkungen (Symptome) der Leukämie verstärkt werden. Die Überlebensrate und die Symptome der Mäuse sollten dokumentiert werden. Ebenfalls sollten die Unterschiede der hämatopoetischen Zellen im Vergleich zu den Kontrollmäusen mittels FACS analysiert werden, um die onkogene Wirkung von PRMT6 im hämatopoetischen System zu bestätigen.

4.1.3 PRMT6 beeinflusst Gene, die mit dem Zellwachstum assoziiert sind

Weiterhin konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass PRMT6 die Expression von Genen reguliert, die das Zellwachstum beeinflussen. Darunter sind Gene, die die Apoptose, Zellwachstum oder auch den Zellzyklus kontrollieren (siehe Abbildung 3. 6 B). Dabei wurde die Expression von den meisten Genen gesteigert, nachdem PRMT6 in diesen Zellen

herunterreguliert wurde (siehe Abbildung 3. 7). Das bestätigt die Annahme, dass PRMT6 meist als Repressor agiert und die Expression von Genen durch die Etablierung von reprimierenden Histonmodifikationen steuert (Kleinschmidt et al, 2012; Neault et al, 2012; Stein et al, 2016; Stein et al, 2012).

Eines der Gene, dessen Expression durch den *Knockdown* von PRMT6 gesteigert wird, ist *CDKN1B* oder auch p27 genannt, welches vornehmlich den Zellzyklus an dem G1-Kontrollpunkt überwacht. Es wird oft als Zellzyklus-Inhibitor-Protein beschrieben, da es den Zellteilungszyklus stoppen oder verlangsamen kann. Der Zellzyklus wird durch die Aktivierung und Inhibition der Cyclin-abhängigen Kinasen (CDKs) gesteuert. Eine Vielzahl von Mechanismen wurden identifiziert, die die CDK-Aktivität beeinträchtigen können, wie die Bindung von INK4 (Cyclin-abhängige Kinase Inhibitoren für CDK4 und CDK6) und CIP/KIP-Inhibitoren (Cyclin-abhängige Inhibitoren für alle Cycline). Während die INK4-Protein spezifisch in der Transition von der G1- zur S-Phase durch die Bindung an CDK4 und CDK6 agieren, können Inhibitoren der CIP/KIP-Familie eine Vielzahl von CDKs inhibieren (Vidal & Koff, 2000). p27 (CDKN1B) ist ein Mitglied dieser Familie. Die anderen beiden Mitglieder der Familie heißen p57 (CDKN1C) und p21 (CDKN1A) (Mainprize et al, 2001). Da die Mitglieder dieser Familie alle Cyclin-CDK-Komplexe inhibieren, sind diese nicht spezifisch einer Phase des Zellzyklus zuzuordnen (Coqueret, 2003). In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass PRMT6 die Expression von *CDKN1B* negativ in K562-Zellen reguliert. Außerdem konnte mittels ChIP-Assay gezeigt werden, dass PRMT6 direkt an den Promotor von *CDKN1B* bindet (Abbildung 3. 8 und 3. 10). Dass *CDKN1B* womöglich ein direktes Zielgen von PRMT6 darstellt, konnten Kleinschmidt und Kollegen in U2OS-Zellen (Osteosarkoma-Zellen) bestätigen. Sie konnten durch Genexpression- und Promotor-Analysen zeigen, dass *p21* und *p27* Zielgene von PRMT6 darstellen. Dabei konnten sie PRMT6 auf dem Promotor von *p21* detektieren. Für *p27* konnten sie nur eine Anreicherung der H3R2-Dimethylierung, die von PRMT6 vermittelt wird, nach Überexpression von PRMT6 auf dem Promotor detektieren (Kleinschmidt et al, 2012). Da PRMT6 keine DNA-Bindedomäne besitzt braucht es einen Interaktionspartner, der die Bindung zum Promotor vermittelt. Wie schon durch Herglotz und Kollegen gezeigt werden konnte, kann RUNX1 PRMT6 zu seinen Zielgenen rekrutieren (Herglotz et al, 2013). In der vorliegenden Arbeit konnte mittels Luciferase-Reporter-Gen-Assay demonstriert werden, dass durch die Kotransfektion mit den Transkriptionsfaktor RUNX1 die Luciferaseaktivität durch die Bindung an den CDKN1B-Promotor reprimiert wird. Während dieser Effekt durch die Kotransfektion mit der RUNX1-Mutante nicht mehr vorhanden ist (Abbildung 3. 9). RUNX1 kann sowohl als transkriptioneller Aktivator, als auch als Repressor agieren. In diesem Fall agiert er als transkriptioneller Repressor, wie in dem Luciferasereporter-Gen-Assay mit dem *CDKN1B*-Promotor durch die Koexpression von RUNX1 bestätigt werden konnte. Von anderen Forschergruppen konnte gezeigt werden, dass

RUNX1 durch die Rekrutierung von Sin3A und Groucho Korepressoren einen reprimierenden Effekt auf die Expression haben kann (Fisher & Caudy, 1998; Javed et al, 2000; Lutterbach & Hiebert, 2000). Außerdem kann RUNX1 ebenfalls Histon-modifizierende Komplexe rekrutieren, wozu auch die Histondeacetylase SUV39H1 gehört und dadurch zur Gen-Stilllegung (*silencing*) beitragen (Reed-Inderbitzin et al, 2006). Durch die Analyse von Daten aus dem UCSC-Genomebrowser und durch die manuelle Analyse der Sequenz konnten potentielle Bindestellen in dem *CDKN1B*-Promotor gefunden werden (Kent et al, 2002). Die Luciferase-Ergebnisse zeigten, dass hierbei vermutlich die RUNX1-Bindestelle ungefähr - 600 bp vor dem Transkriptionsstart entscheidend für die Regulation ist, da der reprimierende Effekt von RUNX1 in den verkürzten Fragmenten des Promotors nicht mehr vorhanden war. Dies konnte auch durch die ChIP-Ergebnisse (Abbildung 3. 10) bestätigt werden. Hier konnte erstmalig gezeigt werden, dass RUNX1 eher in dem Bereich kurz vor dem Transkriptionsstart von *CDKN1B* bindet. Dort konnte eine Anreicherung von RUNX1 und ebenfalls von PRMT6 auf dem *CDKN1B*-Promotor gefunden werden. Es konnte jedoch nicht gezeigt werden, dass PRMT6 und RUNX1 zusammen auf dem Promotor sitzen. Durch einen sequentiellen ChIP-Assay könnte dies weiterführend untersucht und überprüft werden, ob RUNX1 wirklich PRMT6 zu dem *CDKN1B*-Promotor rekrutiert. Ebenfalls könnte man eine Herunterregulation von RUNX1 durch eine lentivirale Transduktion durchführen und anschließend überprüfen, ob PRMT6 noch auf dem *CDKN1B*-Promotor bindet. Diese Rekrutierung von PRMT6 durch RUNX1 konnte schon durch die Arbeitsgruppe um Jörn Lausen auch für andere Zielgene (*CD41*, *KLF1*, *MIR144/451*) beschrieben werden (Herglotz et al, 2013; Kohrs et al, 2016; Kuvardina et al, 2015; Lausen, 2013). Außerdem ist noch nicht eindeutig bewiesen, dass PRMT6 zu dem reprimierenden Effekt in dem Luciferase-Assay beiträgt. Dafür könnten weitere Luciferase-Assays mit einer Koexpression von RUNX1 und PRMT6 zu dem *CDKN1B*-Promotor in HEK293T-Zellen durchgeführt werden.

Die unterschiedlich starken Effekte der Reprimierung von RUNX1 in den unterschiedlichen Zellsystemen liegen vermutlich der unterschiedlichen endogenen Expression der Kofaktoren, die für die Reprimierung nötig sind, zugrunde. Dabei konnten stärkere reprimierende Effekte der Koexpression von RUNX1 in den HEK293T-Zellen beobachtet werden, da in diesen Zellen nicht so viel endogenes RUNX1 vorliegt, wie in den K562-Zellen (Thul & Lindskog, 2018). In den K562-Zellen fällt der reprimierende Effekt auf die Luciferase-Aktivität geringer aus, da vermutlich schon eine Reprimierung in den Kontrollzellen auf den *CDKN1B*-Promotor vorhanden ist.

4.1.4 PRMT6-Inhibitoren als möglicher Ansatzpunkt einer Leukämie-Therapie

DNA-bindende Transkriptionsfaktoren, wie RUNX1 erscheinen nicht als gute Ziele für eine Entwicklung von *small molecule*-Inhibitoren für eine Krebstherapie. Sie sind essentiell für regulatorische Funktionen und deswegen für eine Inhibition nicht geeignet. Hingegen stellen epigenetische Faktoren attraktive Ziele für eine Krebstherapie dar, da sie durch ihre enzymatische Aktivität die Genexpression modulieren (Durst & Hiebert, 2004). Epigenetische Modifikationen sind generell reversibel, die linienspezifisch in der Genexpression während der Differenzierung, Zellteilung und DNA-Reparatur unterschiedlich sein können. Diese angelegte Plastizität der epigenetischen Modifikationen macht sie für eine pharmakologische Inhibition empfänglich. Zum Beispiel konnten HDACi, wie Phenylbutyrat und Depsipeptid schon in klinischen Studien getestet werden (Furumai et al, 2002; Wagner et al, 2010; Warrell et al, 1998). Ebenso sind Protein-Arginin-Methyltransferasen, wie PRMT6 interessante Ziele für die Entwicklung von Inhibitoren, da sie wie oben erwähnt in verschiedenen Krebsarten dysreguliert sind (Yoshimatsu et al, 2011). Durch den Einsatz von *small molecules* für eine Krebstherapie, die auf epigenetische Enzyme abzielen, soll das Tumorwachstum verringert und eine Verminderung der Teilung der Krebszellen erreicht werden. In dieser Arbeit wurden verschiedene Inhibitoren für PRMT6 auf ihren Effekt auf das Tumorwachstum mittels XTT-Assay untersucht. Dabei hatte etwa die Hälfte der getesteten Inhibitoren einen wachstumsinhibierenden Effekt auf die Leukämie-Zelllinie K562. Die getesteten Inhibitoren wurden von den Kooperationspartnern Prof. Manfred Jung und Prof. Wolfgang Sippl bereitgestellt. Diese Inhibitoren sind künstlich synthetisiert und binden in der enzymatischen Tasche von PRMT6. Dadurch können sie die enzymatische Aktivität von PRMT6 inhibieren. Mittels XTT-Assay konnte ein wachstumsinhibierender Effekt besonders durch den Inhibitor Lie1417 gezeigt werden. Mit einer Herunterregulation von PRMT6 durch eine lentivirale Transduktion konnte ebenfalls ein wachstumsinhibierender Effekt in einer Wachstumskurve und in einem *Xenograft*-Experiment gezeigt werden. So kann festgestellt werden, dass beide Inhibitionen von PRMT6 einen wachstumsinhibierenden Effekt haben. Ähnliche Versuche wurden schon durch die Inhibition für PRMT5 durchgeführt. Der Inhibitor EPZ015666 agiert als ein potenter, selektiver Inhibitor von PRMT5 ($IC_{50} = 22\text{nM}$) und zeigt eine antiproliferative Wirkung in Z-138 *mantle cell lymphoma* Zelllinien und Maver 1 ($EC_{50} = 96$ und 450nM). Diese potente Wirkung des Inhibitors liegt vermutlich der starken Überexpression von PRMT5 in dieser Tumorart zugrunde. EPZ015666 besitzt weiterhin eine *in vivo* anti-Tumoraktivität in einem Xenograft-Mausmodell in den Zelllinien Z-138 und Maver-1 und inhibiert somit auch das Tumorwachstum (Chan-Penebre et al, 2015).

Da *CDKN1B*, wie eben beschrieben ein direktes Zielgen von PRMT6 darstellt, wurde ebenfalls die Expression von *CDKN1B* nach Inhibitor-Behandlung gemessen. Alle Inhibitoren, die

einen wachstumsinhibierenden Effekt zeigten konnten auch eine erhöhte Expression von *CDKN1B* erreichen. So kann festgestellt werden, dass diese Inhibitoren ähnliche Effekte haben und auch ähnliche Zielgene beeinflussen, wie die Herunterregulation durch shRNAs. Weiterhin könnten noch andere Zielgene von PRMT6 nach Inhibitor-Behandlung getestet werden, um zu bestätigen, dass die Inhibitoren ähnliche Effekte wie eine Herunterregulation von PRMT6 haben. Außerdem zeigte der Inhibitor Lie1417 eine Verringerung der PRMT6-Expression, wenn die K562-Zellen mit der IC_{50} -Konzentration behandelt wurden (siehe Abbildung 3. 13). Da die synthetisierten Inhibitoren in dem enzymatischen Aktivitätszentrum von PRMT6 binden sollten, sollte keine Verringerung der Expression von PRMT6 eintreten. Dieser reprimierender Effekt, der nach der Inhibitor-Behandlung mit Lie1417 auftritt, könnte auf Sekundäreffekte des Inhibitors zurückzuführen sein. So könnte durch die Inhibitor-Behandlung andere Faktoren blockiert werden, die für die Expression von PRMT6 wichtig sind. Weiterhin zeigte dieser Inhibitor die stärkste Wachstumsinhibition. Durch diese starke Wachstumsinhibition von Lie1417 könnten andere Signalkaskaden ausgelöst werden, die wiederum eine Herunterregulation von PRMT6 und anderen Proteinen zur Folge hat.

Weiterhin konnte gezeigt werden, dass dieser Inhibitor einen G0/1-Arrest im Zellzyklus im Vergleich zur DMSO-behandelten Kontrolle auslöst (siehe Abbildung 3. 13). Dabei verringerten sich die Zellen, die sich im G2/M-Zyklus befanden eindeutig im Vergleich zur Kontrolle. Ähnliche Ergebnisse konnten auch schon Wang und Kollegen zeigen, bei denen die Zellen, die sich in der G1-Phase befanden mit Inhibitor-Behandlung anstiegen (Wang et al, 2017).

Die in dieser Arbeit getesteten *small molecules* sollten noch verbessert werden und könnten als Ausgangsinhibitoren für eine weitere Entwicklung und Verbesserung dienen. Bis jetzt hat die Forschergruppe um Mitchell (2015) eine Aryl-Pyrazol-Verbindung (EPZ020411) gefunden, die sehr spezifisch für PRMT6 ist. Mit diesem Molekül konnte eine IC_{50} -Konzentration von 10 nM erreicht werden, die anders als in dieser Arbeit, mittels eines SAR-Assays (*Structure-activity relationships*) berechnet wurde. Bei diesem Assay können verschiedene Methoden angewandt werden. In diesem Fall wurde ein biochemischer Assay mit „schwerem“ SAM (3H-SAM) als Methyl donor benutzt um die IC_{50} -Konzentration zu messen, ein SPA-Assay (*scintillation proximity assay*). Die IC_{50} -Konzentration in Zellen wurde anschließend ebenfalls berechnet. A375 Zellen (Melanoma-Zelllinie) wurden transient mit PRMT6 transfiziert und die Inhibition der durch PRMT6-vermittelten H3R2-Dimethylierung Dosis-abhängig titriert. Dadurch konnte in diesen Zellen eine IC_{50} -Konzentration von 0,64 μ M berechnet werden. Die IC_{50} -Konzentration für PRMT1 lag in den Zellen dabei 10-fach höher, sodass hier von einer gewissen Spezifität für PRMT6 ausgegangen werden kann (Mitchell et al, 2015). Eine andere Arbeitsgruppe entwickelte ebenfalls einen Inhibitor für PRMT-Typ-I-Methyltransferasen (MS023), bei dem die IC_{50} -Konzentration mit 4 nM für PRMT6 mittels SAR-Assay ebenfalls

sehr gering ist. In HEK293T-Zellen konnte eine IC_{50} -Konzentration von 56 nM für MS023 durch die Verringerung der H3R2-Dimethylierung berechnet werden (Eram et al, 2016).

Die in dieser Arbeit getesteten Inhibitoren sollten ebenfalls noch weiter entwickelt werden und speziell die IC_{50} -Konzentrationen in Abhängigkeit der Verringerung der H3R2-Dimethylierung der jeweiligen Moleküle gemessen werden, um diese mit den schon vorhandenen Inhibitoren zu vergleichen.

4.2 PRMT6 beeinflusst die Differenzierung hämatopoetischer Zellen

RUNX1 ist ein entscheidender Faktor für die Entwicklung von hämatopoetischen Stammzellen und in der Entstehung von Leukämie. Durch die Rekrutierung von Kofaktoren an seine Zielgene bestimmt es die Wirkung auf die Expression. Das Zusammenspiel zwischen Transkriptionsfaktoren und ihren epigenetischen Kofaktoren ist entscheidend für die Etablierung und Erhaltung eines zelltypspezifischen Expressionsprogramms. Während dieses Prozesses wird der Chromatinstatus zelltypspezifischer Gene aufgrund Differenzierungsentscheidungen an Verzweigungspunkten hämatopoetischer Zellen verändert. Bei diesen Linienentscheidungen aktivieren Veränderungen in den DNA- und Histonmodifikationsmuster das Genexpressionsprogramm auf Kosten eines anderen. Einer dieser Kofaktoren stellt die Protein-Arginin-Methyltransferase 6 dar, welche in Progenitorzellen mit RUNX1 megakaryozytäre Gene, wie CD41, reprimiert (Herglotz et al, 2013). Durch den funktionellen Zusammenhang des Transkriptionsfaktors RUNX1 und des Kofaktors PRMT6, spielt die Protein-Arginin-Methyltransferase womöglich auch eine Rolle in der Differenzierung. Da RUNX1 sehr entscheidend bei der Entwicklung von Megakaryozyten oder Erythrozyten aus deren Vorläufern ist (Kuvardina et al, 2015), wurde der Effekt von PRMT6 an diesem Differenzierungspunkt untersucht. Dabei konnte durch die vorliegende Arbeit neue Erkenntnisse in der Rolle von PRMT6 in der erythroiden/megakaryozytären Differenzierung hämatopoetischer Zellen gewonnen werden.

4.2.1 PRMT6 beeinflusst die Erythropoese und das erythroide Genexpressionsprogramm

In der vorliegenden Arbeit konnten neue Beobachtungen zur Genexpressionskontrolle während der megakaryozytären/erythroiden Linienentscheidung gemacht werden. Es konnte gezeigt werden, dass PRMT6 einen negativen Einfluss auf die Erythropoese bei der Linienentscheidung hat. Durch die CFU-Assays (siehe Abbildung 3. 14) konnte demonstriert werden, dass bei einer Herunterregulation von PRMT6 mittels *Knockdown* die Erythropoese verstärkt wird, während eine Überexpression von PRMT6 eine Inhibition der erythroiden Differenzierung zur Folge hat. Die Analyse von murinen Zellen in einem CFU-Assay ergaben ähnlich Ergebnisse. Ein CFU mit murinen Zellen hat den Vorteil, dass die erythroiden, als auch die megakaryozytären Kolonien ausgezählt werden können, die sich in dem humanen Methylcellulose-*Cocktail* nicht bilden können. Durch eine lentivirale Überexpression von PRMT6 konnte eine signifikante Verringerung der erythroiden Kolonien im Vergleich zu der Kontrolle gezeigt werden. Die Kolonienanzahlen der megakaryozytären Kolonien zeigten nur eine leichte Tendenz zur Erhöhung. So könnte eine Verschiebung der Balance zwischen der Bildung von Erythrozyten und Megakaryozyten, zugunsten der Megakaryozyten zutreffen. Eine genaue Analyse der PRMT6-Funktion an dem Verzweigungspunkt des erythroiden und megakaryozytären Vorläufer wäre sehr interessant. Dazu könnte ein hämatopoetisches *Knockout*-Maus-Modell verwendet werden, um den Effekt des Fehlens von PRMT6 auf den MEP-Vorläufer im Vergleich zur Kontrolle zu untersuchen. Durch eine FACS-Analyse könnten außerdem die unterschiedlichen Differenzierungs- und Vorläuferstadien der Erythrozyten und Megakaryozyten untersucht werden, um herauszufinden welche Entwicklungsstadien betroffen sind. Durch die Messung von Oberflächenmarkern, wie CD71 und Ter119 (wird mit Glykophorin A koexprimiert) können verschiedene Stadien der erythroiden Vorläufer (Koulnis et al, 2011) und durch Marker wie CD41 und CD42d zwischen frühen und späten megakaryozytären Marker unterschieden werden.

In dieser Arbeit konnte weiterhin durch eine bioinformatische Analyse von *Microarray*-Genexpressionsdaten nach Herunterregulation von PRMT6 in K562-Zellen, Gene identifiziert werden, die in der Hämatopoese und Erythropoese beteiligt sind (siehe Abbildung 3. 16). Dabei wurden Gene detektiert, die nach PRMT6-*Knockdown* einerseits herunterreguliert und andererseits hochreguliert waren. Dies weist auf eine reprimierende und eine aktivierende Wirkung von PRMT6 hin. Dies unterstützt die Annahme, dass PRMT6 meist als Repressor fungiert. Jedoch ist ebenfalls eine aktivierende Rolle von PRMT6 denkbar. Wie Casadio und Kollegen beschreiben konnten, ist PRMT6 in der Lage die Dimethylierung von H3R42me2a zu katalysieren, welche eine Histonmodifikation darstellt, die nicht an dem Histonschwanz erfolgt. Dadurch hat diese Modifikation einen positiven Effekt auf die Transkription, da wo-

möglich die DNA-Histon-Bindung herabgesetzt wird (Casadio et al, 2013). Außerdem sind Sekundäreffekte denkbar, bei denen durch die PRMT6-Herunterregulation Gene beeinflusst werden, die wiederum die Expression anderer Gene aktivieren. Einige der erythroiden Gene, die durch die bioinformatische Analyse identifiziert wurden, konnten auch mittels Expressionsanalyse in K562-Zellen bestätigt werden (siehe Abbildung 3. 17). Die Hochregulation der erythroiden Gene konnte auch nach PRMT6-*Knockdown* in CD34+-Zellen, die in einem speziellen Medium kultiviert wurden, verifiziert werden. Diese Veränderung der Expression der erythroiden Marker kann auch durch die Oberflächenexpression der Zellen bestätigt werden. So konnte in K562-Zellen, transduziert mit sh-PRMT6, eine Erhöhung der erythroiden Marker CD235a und CD71 und eine Erniedrigung des megakaryozytären CD41-Marker auf der Oberfläche verzeichnet werden. Ähnliche Ergebnisse in der Oberflächenexpression nach PRMT6-*Knockdown* (siehe Tabelle 3. 1) konnten auch in CD34+-Zellen bestätigt werden. Eine Überexpression von PRMT6 resultierte in einer gegensätzlichen Oberflächenexpression der CD-Moleküle (siehe Abbildung 3. 25).

So konnte in dieser Arbeit erstmalig gezeigt werden, dass PRMT6 eine zentrale Rolle in der erythroiden Entwicklung inne hat und durch Manipulation von PRMT6 sowohl die erythroide, als auch die megakaryozytäre Differenzierung, beeinflusst werden kann. Da Glykophorin A ein zentraler Marker der Erythropoese darstellt und ein Zielgen von PRMT6 darstellt, wurde dieses Gen näher untersucht.

4.2.2 GYP A ist ein direktes Zielgen von PRMT6

In dieser Arbeit konnte erstmalig gezeigt werden, dass GYP A ein direktes Zielgen von PRMT6 darstellt. Dabei weisen die gezeigten Daten ebenfalls darauf hin, dass RUNX1 zu der Rekrutierung von PRMT6 beiträgt. Durch eine sequentielle Chromatin-Immunopräzipitation konnte zunächst gezeigt werden, dass PRMT6 und RUNX1 zusammen auf dem GYP A-Promotor sitzen (siehe Abbildung 3. 19 C). Der *Knockdown* von RUNX1 und der anschließende ChIP-Assay bestätigt, dass RUNX1 für die Rekrutierung von PRMT6 benötigt wird (siehe Abbildung 3.20 A-C). Außerdem ist die Expression von GYP A vermindert wenn RUNX1 durch shRNAs hochreguliert ist (siehe Abbildung 3.20 D-E). Ähnliches konnte schon für das Zielgen *KLF1* von Kuvardina *et al.* (2016) demonstriert werden. RUNX1 reprimiert das erythroide Genexpressionsprogramm während der megakaryozytären Differenzierung und rekrutiert zur Etablierung eines repressiven Komplexes ebenfalls PRMT6 zu dem Promotor von *KLF1*. Dadurch konnte eine vermehrte Expression der Histonmodifikation H3R2me2 gemessen werden. Im Gegensatz dazu verringerten sich die aktivierenden His-

tonmodifikationen (H3K4me3, H3K9ac) und aktivierende Transkriptionsfaktoren, wie GATA1, WDR5 und p300 auf dem erythroiden *KLF1*-Promotor (Kuvardina et al, 2015). In der vorliegenden Arbeit konnte gleichermaßen demonstriert werden, dass die reprimierenden Histonmodifikationen H3K27me3 und die von PRMT6 vermittelte H3R2me2, während der megakaryozytären Differenzierung der Progenitorzellen auf dem *GYP A*-Promotor zunahm. Die Etablierung einer reprimierenden Chromatinumgebung führt dann auch zu der Verringerung der aktiven Histonmodifikation H3K4me3 auf dem Promotor. Die Histonmodifikation H3R2me2a ist ein negativer Regulator der H3K4-Trimethylierung, da sie die Aktivität der H3K4-Methyltransferase MLL1 inhibiert. Dadurch wird die Rekrutierung von WDR5, ebenfalls ein wichtiger Faktor des MLL-Komplexes, zu Histon H3 blockiert (Guccione et al, 2007; Hyllus et al, 2007; Iberg et al, 2008). Kristallstrukturanalysen von WDR5 unterstützen die Annahme des Antagonismus zwischen den beiden Modifikationen, da die Wasserstoffbrückenbindung zwischen der WD40-Domäne von WDR5 und der Guanidingruppe von H3R2 durch die asymmetrische Methylierung gestört ist (Couture et al, 2006; Ruthenburg et al, 2006). Dementsprechend führt eine Überexpression von PRMT6 zu einer globalen Reduktion des H3K4me3-Levels und ChIP-Analysen zeigen ebenfalls eine negative Korrelation zwischen H3K4me3 und H3R2me2a (Guccione et al, 2007; Hyllus et al, 2007). So kann dieser Effekt auch schon auf anderen Zielgenen beobachtet werden, wie auf *HOX*-Genen, *MYC*-Zielgenen und *TSP1* (Guccione et al, 2007; Hyllus et al, 2007; Iberg et al, 2008; Michaud-Levesque & Richard, 2009).

Der „Gegenspieler“ von PRMT6, die Peptidylarginin-Deiminase 4 (PADI4), konnte nach megakaryozytärer Differenzierung weniger auf dem Promotor gefunden werden. PADI4 konvertiert Arginin-Reste an Histonschwänzen zu Citrullin (Hagiwara et al, 2002). Die Citrullinierung kann an unmodifizierten oder auch schon methylierten Argininen erfolgen und somit der Arginin-Methylierung durch PRMTs entgegenwirken (Cuthbert et al, 2004; Denis et al, 2009; Li et al, 2008; Wang et al, 2004; Yao et al, 2008). Dies konnte ebenfalls auf dem Promotor von *IL6ST* veranschaulicht werden. Wenn PADI4 durch shRNAs herunterreguliert wurde, konnte PRMT6 vermehrt auf dem Promotor binden und die Histonmodifikation H3R2me2 etablieren (Kolodziej et al, 2014).

Außerdem konnten PRMT6 und RUNX1 in der vorliegenden Arbeit auf Progenitorzellen auf dem *GYP A*-Promotor detektiert und während der megakaryozytären Differenzierung vermehrt auf dem Promotor gefunden werden. Interessanterweise ist PRMT6 ebenso auf dem Promotor des megakaryozytären Gens *CD41* in Vorläuferzellen zu finden. In diesem Fall führte der Verlust von PRMT6 zu einer Hochregulation der Expression von CD41 in CD34⁺-Zellen, wenn diese in Expansionsmedium kultiviert wurden (Herglotz et al, 2013). So kann RUNX1 im Zuge der megakaryozytären Differenzierung megakaryozytäre Gene aktivieren

(Herglotz et al, 2013) und in den gleichen Zellen zusammen mit PRMT6 in einem reprimierenden Komplex die Transkription erythroider Gene inhibieren (Kuvardina et al, 2015). So agiert der RUNX1/PRMT6-Komplex in zwei verschiedenen Weisen, einmal in Progenitorzellen auf megakaryozytären Genen und einmal auf erythroiden Genen während der megakaryozytären Differenzierung (Herglotz et al, 2013; Kohrs et al, 2016; Kuvardina et al, 2015). Wie die Bildung der unterschiedlichen RUNX1-Komplexe reguliert wird, ist noch nicht bekannt. Jedoch könnten die verschiedenen Promotoren und der Modifikationsstatus von RUNX1 dafür verantwortlich sein (Draper et al, 2016; Huang et al, 2012; Wang et al, 2009; Zhao et al, 2008). Beispielsweise konnten Zhao *et al.* zeigen, dass RUNX1 durch PRMT1 posttranskriptionell an seinen Arginin-Resten methyliert und dadurch die Bindung zu dem Repressor SIN3A herabgesetzt wird. Somit fungiert in diesem Falle PRMT1 als transkriptioneller Koaktivator der RUNX1-Funktion (Zhao et al, 2008). Somit ist es denkbar, dass RUNX1 auch von PRMT6 methyliert werden kann, da auch PRMT1 in der Lage ist Histon- und nicht-Histon-Proteine zu methylieren. Außerdem wurde für PRMT6 schon gezeigt, dass es auch Nicht-Histon-Proteine methylieren kann (Boulanger et al, 2005; El-Andaloussi et al, 2006; Han et al, 2014; Miranda et al, 2005; Scaramuzzino et al, 2015; Sgarra et al, 2006; Stavride et al, 2013). So könnte durch in vitro-Methylierungsversuche dies weiterführend untersucht werden. Zudem kann sich PRMT6 auch automethylieren, was ebenfalls die Zusammensetzung des Komplexes verändern könnte (Singhroy et al, 2013). Weiterhin könnten verschiedene Isoformen von RUNX1 die Protein-Protein-Interaktionen in den gleichen Zellen auf unterschiedlichen Promotoren verändern. Kürzlich konnte gezeigt werden, dass verschiedene RUNX1-Isoformen in Megakaryozyten im Vergleich zu erythroiden Zellen exprimiert werden. Durch die verschiedenen Promotoren distal (P1) und proximal (P2) werden verschiedene Isoformen von RUNX1 transkribiert. Mit Hilfe eines speziellen Mausmodells (*dual reporter mous model*) konnten die Autoren demonstrieren, dass der distale P1-Promotor in adulten hämatopoetischen Stammzell- und Vorläuferpopulationen aktiv ist. Im Gegensatz dazu ist die Aktivität des proximalen P2-Promotors mehr auf die unreifen LSK (Lineage⁻ Sca1^{high} cKit^{high}) und Prä-megakaryozytäre/erythroide Vorläufer beschränkt. Dabei markiert eine stärkere Aktivität von P2 den Verlust des erythroiden Potentials und eine verstärkte Bildung von Megakaryozyten-Vorläufer (Draper et al, 2016).

Zusammenfassend weisen die gezeigten Daten darauf hin, dass PRMT6 eine essentielle Rolle in der epigenetischen Regulierung des erythroiden Genexpressionsprogramm während der megakaryozytären Differenzierung hat. Die Annahme, dass dieser RUNX1/PRMT6-Komplex diese Reprimierung vermittelt, wird durch die Beobachtung unterstützt, dass sowohl ein RUNX1-*Knockdown*, als auch ein PRMT6-*Knockdown* gleichermaßen zu einer erhöhten GYPA- und KLF1-Expression führt (Kuvardina et al, 2015). Da PRMT6 nicht selbst an die DNA binden kann ist die physische Interaktion mit Transkriptionsfaktoren, wie RUNX1, als

auch mit anderen Transkriptionsfaktoren, von Nöten. Eine Analyse des ganzen Interaktoms in verschiedenen Differenzierungsstadien wäre interessant, um zu klären welche Transkriptionsfaktoren essentiell sind und in welchen Entwicklungsstadien sich die Zusammensetzung des Komplexes verändert. Zum Beispiel konnte gezeigt werden, dass PRMT6 auch mit dem Transkriptionsfaktor TAL1 assoziiert ist (Kolodziej et al, 2014). Das unterstützt ebenso die Hypothese, dass PRMT6 Teil von verschiedenen genregulatorischen Komplexen, abhängig vom Zelltyp und Promotor, sein kann. Außerdem wurde von der Arbeitsgruppe um Stein und Kollegen berichtet, dass PRMT6 auch mit Mitgliedern des Polycomb-Komplexes (PRC) interagieren kann und dadurch zur PRC-vermittelten Repression beiträgt (Stein et al, 2016). Zu diesem Zeitpunkt bleibt es noch unklar, ob PRMT6 auch mit einem größeren transkriptionellen Komplex assoziiert ist.

4.2.3 Eine Inhibition von PRMT6 beeinflusst die erythroide Differenzierung

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass PRMT6 einen Effekt auf die Differenzierung hat und eine Herunterregulation von PRMT6 mittels *Knockdown* die erythroide Differenzierung begünstigt. Durch eine Inhibitor-Behandlung mit MS023 konnte sowohl die Glykophorin A -Expression auf RNA-Ebene, als auch auf der Oberfläche der Zellen gesteigert werden (siehe Abbildung 3. 28 A-C). Der PRMT-Typ-I-Inhibitor MS023 ist mit einer IC_{50} -Konzentration von 4 nM in einem SPA-Assay und mit einer IC_{50} -Konzentration von 56 nM in einem zellulären Assay in HEK293T-Zellen, der Inhibitor, der derzeit PRMT6 am besten inhibiert (Eram et al, 2016). Die IC_{50} -Konzentration in den Zellen wurde aufgrund der Verminderung der H3R2-Dimethylierung in Abhängigkeit der Konzentration des Inhibitors berechnet (Eram et al, 2016). MS023 wurde basierend auf der Struktur von dem 3-Trifluoromethylpyrazol EPZ020411, welcher als PRMT4- und PRMT6-Inhibitor beschrieben ist, synthetisiert und verbessert.

Weiterhin konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass die Expression anderer erythroider Gene durch die pharmakologische Inhibition von PRMT6 in CD34+-Zellen und in K562-Zellen gesteigert werden konnte (siehe Abbildung 3. 28 D-G und 3. 30). Ferner konnte die Oberflächenexpression von CD235a und CD71 durch die Inhibitor-Behandlung erhöht werden. Schließlich kann festgestellt werden, dass der *Knockdown*, als auch die pharmakologische Inhibition von PRMT6 die Erythropoese in CD34+-Zellen verstärkt. Zurzeit werden viele Versuche unternommen, um effiziente *in vitro* Protokolle für die Entwicklung von therapeutischen Zellen aus hämatopoetischen oder embryonischen Stammzellen zu etablieren (Batta et al, 2016). *Small molecules*, die auf epigenetische Faktoren abzielen, wie PRMT6, könnten in Zukunft zu einer effektiveren *in vitro* Differenzierung beitragen.

Bluttransfusionen gehören immer noch zu den essentiellen und am häufigsten angewandten Zelltherapien, die stark von der Verfügbarkeit des Spendermaterials abhängen. In den westlichen Ländern decken die freiwilligen Blutspenden die meisten Transfusions-Bedürfnisse, aber in vielen Entwicklungsländern bestehen Engpässe an RBCs (*red blood cells*). Jedoch wird aufgrund demographischer Entwicklungen in der westlichen Welt mit einem höheren Anteil älterer Leute, die mit einer höheren Wahrscheinlichkeit Bluttransfusionen benötigen und einem geringen Anteil an jüngeren Spendern, die Spenderverfügbarkeit in den nächsten 20-30 Jahren weiterhin abnehmen (Ali et al, 2010). Somit werden neue Versuche immer wichtiger um eine therapeutische Produktion von RBCs *ex vivo* zu etablieren. Die erste Methode für die Entwicklung von cRBCs (*cultured red blood cells*) in Flüssigkultur wurde von Fibach und Kollegen entwickelt. Diese Arbeitsgruppe beschrieb ein zwei-Stufen-Protokoll, bei dem zunächst eine Vervielfältigung und anschließend eine selektive Begünstigung der erythroiden Vorläufer stattfindet, die zuvor aus Nabelschnurblut oder adultem peripherem Blut gewonnen wurden (Fibach et al, 1989). Diese Methode führte zwar zur effektiven Bildung von erythroiden Vorläufern, aber nicht zu einer hohen Anzahl von RBCs. Die Entwicklung von RBCs in hohen Dosen, die für eine Transfusion benötigt wird, bleibt also weiterhin eine Herausforderung. Viele Methoden wurden entwickelt, um das bestehende Protokoll zu verbessern (Freyssinier et al, 1999; Panzenbock et al, 1998). Weiterhin konnte gezeigt werden, dass eine kurze Behandlung von CD34+-Zellen mit einem bestimmten Zytokin-Cocktail, der die erythroide Differenzierung begünstigt, und eine anschließende Stammzell-Expansion mit nachfolgender Vorläufer-Expansion eine größere Mengen an erythroiden Zellen erreichen als zuvor (Olivier et al, 2012). Ein weiterer Ansatz ist die Entwicklung einer Zelllinie aus primären Zellen oder aus iPSCs, die in großen Mengen produziert werden, bei denen dann durch Zusatz von *small molecules* die terminale Differenzierung eingeleitet werden könnte (Okita & Yamanaka, 2011). So könnte beispielsweise ein PRMT6-Inhibitor eines dieser Moleküle sein, um zur Verbesserung der *ex vivo* Protokollen beizutragen.

Weiterhin wurde in dieser Arbeit gezeigt, dass die Inhibition von PRMT6 in CD34+-Zellen in einem CFU-Assay in eine verminderte Anzahl von Kolonien resultierten. Diese verringerte Anzahl an Kolonien wurde auch durch die Inhibition durch shRNAs gegen PRMT6 in CD34+-Zellen erreicht. Durch verschiedene Arbeitsgruppen konnte bereits gezeigt werden, dass PRMT6 die Zellproliferation und die Seneszenz reguliert (Kleinschmidt et al, 2012; Phalke et al, 2012; Stein et al, 2012). Auch in dieser Arbeit konnte demonstriert werden, dass ein anderer Inhibitor Lie1417 den Zellzyklus beeinflusst und die Zellen in der G1-Phase arretiert. Außerdem konnte dargestellt werden, dass der Inhibitor einen Effekt auf das Zellwachstum in einem XTT-Assay hatte. Für eine genaue Aussage über

die Wirkung von MS023 auf das Zellwachstum sollte eine detailliertere Untersuchung des Zellzyklus, der Apoptose und der Seneszenz durchgeführt werden.

Durch einen Histon-Western-Blot konnte demonstriert werden, dass der Inhibitor MS023 auch in K562-Zellen die Modifikation H3R2me2a inhibiert, jedoch nicht die Histonmodifikation H4R3me2a. Damit konnte die PRMT6-Spezifität bewiesen werden, da PRMT1 dafür bekannt ist H4R3 zu methylieren und so zu dem Histon-Code beiträgt (Wang et al, 2001). Das bedeutet, dass der Inhibitor nur PRMT6 blockiert, aber nicht PRMT1. Obwohl PRMT1, PRMT3, PRMT6 und PRMT8 *in vitro* oft ihre Substrate teilen, scheint es *in vivo* nicht so zu sein (Yang & Bedford, 2013). Beispielsweise weisen Zellen von PRMT3-*Knockout*-Mäusen eine Hypomethylierung des 40S ribosomalen Proteins 2 (RPS2) auf (Swiercz et al, 2007), während Zellen von PRMT4-*Knockout*-Mäusen eine Hypomethylierung von polyadenylate-binding protein 1 (PABP1) aufzeigen (Yadav et al, 2003). PRMT1-*Knockout*-Zellen weisen einen starken Verlust an Methylierung vieler Substraten auf (Yu et al, 2009) und PRMT6-*Knockout*-Zellen zeigen eine verringerte Methylierung von H3R2 (Guccione et al, 2007; Hyllus et al, 2007; Iberg et al, 2008). Weiterhin konnte die Spezifität des Inhibitors MS023 in dieser Arbeit mittels ChIP-Assay auf dem *GYPA*-Promotor verdeutlicht werden. Durch eine Inhibitor-Behandlung mit MS023 konnte eine Verringerung der H3R2-Dimethylierung, jedoch keine Beeinflussung der H4R3me2a-Modifikation gefunden werden.

Außerdem konnte eine Erhöhung der H3K4-Trimethylierung dargestellt werden, womit der „*Crosstalk*“ dieser Modifikationen erneut bewiesen werden konnte (Guccione et al, 2007; Hyllus et al, 2007; Iberg et al, 2008).

4.3 Ausblick

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass PRMT6 als Ziel einer möglichen Krebs-Therapie fungieren könnte. PRMT6 agiert generell eher als transkriptioneller Suppressor, da es die reprimierende Histonmodifikation H3R2me2a an seinen Zielgenen etabliert. Interessanterweise konnte vor kurzem ein Forscherteam um Nicholas Veland 2017 herausfinden, dass eine PRMT6-Hochregulation in Krebszellen mit einer DNA-Hypomethylierung zusammenhängt. Sie konnten zeigen, dass PRMT6 die DNA-Methylierung negativ reguliert indem es die Chromatinbindung von UHRF1 (*Ubiquitin-like containing PHD and RING finger domains 1*), ein Kofaktor von DNMT1 (Bostick et al, 2007), beeinträchtigt. Der Effekt tritt vermutlich durch die Histonmodifikation H3R2me2a in Kraft, welche die Interaktion zwischen UHRF1 und dem Histon H3 inhibiert (Veland et al, 2017). Die DNA-Methylierung von CpG-Inseln hat eine reprimierende Wirkung auf das Chromatin und tritt in Krebszellen oft an Tu-

morsuppressorgenen auf. Dieser Effekt steigert die Möglichkeit für PRMT6 als Ziel einer Therapie. Es bleibt jedoch noch unklar in welchem Umfang die PRMT6-abhängige DNA-Hypomethylierung zur Tumorentstehung und Erhaltung des Tumor-Phänotyps beiträgt. Die Blockierung der DNA-Methylierung hat also einen aktivierenden Effekt auf das Chromatin. Diese aktivierende Funktion von PRMT6 ist sehr interessant, da PRMT6 auf anderen Zielgenen sonst als Repressor agiert. PRMT6 etabliert die Histonmodifikation H3R2me2a und blockiert dadurch die Trimethylierung von H3K4me3. Die aktivierende H3K4me3-Modifikation ist gegensätzlich zu der reprimierenden Histonmodifikation H3K27me3 im humanen Genom verteilt. Die Trimethylierung von H3K27 ist mit inaktiven Promotoren assoziiert. Der Mono- und Dimethylierungsstatus ist weniger gut erforscht. Jedoch zeigte eine H3K27me2 eine ähnliche Verteilung wie eine Trimethylierung von H3K27, während eine Monomethylierung mit aktiven Promotoren assoziiert ist (Barski et al, 2007). Diese Korrelation der Histonmodifikationen könnte also auch global auf eine reprimierende Rolle von PRMT6 hinweisen. Aus diesem Grund wäre ebenso interessant die Verteilung der H3R2-Dimethylierung im Genom zu untersuchen, um eine Korrelation der H3K27me3 und der H3R2-Dimethylierung zu bestätigen.

Zusammenfassend kann PRMT6 sowohl eine aktivierende Rolle durch die Inhibition der DNA-Methylierung, als auch eine reprimierende Wirkung durch die Etablierung der H3R2-Dimethylierung im Genom haben. Die Analyse der gegensätzlichen Rolle von PRMT6 in der Genexpressionskontrolle wäre ein wichtiger Schritt für das Verstehen der Funktion von PRMT6 in der normalen Differenzierung von Zellen und bei der Krebsentstehung.

5 Literaturverzeichnis

Abramovich C, Yakobson B, Chebath J, Revel M (1997) A protein-arginine methyltransferase binds to the intracytoplasmic domain of the IFNAR1 chain in the type I interferon receptor. *EMBO J* 16: 260-266

Ahn MY, Huang G, Bae SC, Wee HJ, Kim WY, Ito Y (1998) Negative regulation of granulocytic differentiation in the myeloid precursor cell line 32Dcl3 by ear-2, a mammalian homolog of *Drosophila* seven-up, and a chimeric leukemogenic gene, AML1/ETO. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95: 1812-1817

Akashi K, Kondo M, Cheshier S, Shizuru J, Gandy K, Domen J, Mebius R, Traver D, Weissman IL (1999) Lymphoid development from stem cells and the common lymphocyte progenitors. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 64: 1-12

Akashi K, Traver D, Miyamoto T, Weissman IL (2000) A clonogenic common myeloid progenitor that gives rise to all myeloid lineages. *Nature* 404: 193-197

Ali A, Auvinen MK, Rautonen J (2010) The aging population poses a global challenge for blood services. *Transfusion* 50: 584-588

Alinari L, Mahasen KV, Yan F, Karkhanis V, Chung JH, Smith EM, Quinion C, Smith PL, Kim L, Patton JT et al (2015) Selective inhibition of protein arginine methyltransferase 5 blocks initiation and maintenance of B-cell transformation. *Blood* 125: 2530-2543

Allis CD, Jenuwein T, Reinberg D, Caparros M-L (2007a) *Epigenetics*, New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press

Allis CD, Jenuwein T, Reinberg D, Caparros M-L (2007b) *Epigenetics*. Cold Spring Harbor Laboratory Press New York

Angiolillo DJ, Capodanno D, Goto S (2010) Platelet thrombin receptor antagonism and atherothrombosis. *Eur Heart J* 31: 17-28

Antony-Debre I, Bluteau D, Itzykson R, Baccini V, Renneville A, Boehlen F, Morabito M, Droin N, Deswarte C, Chang Y et al (2012) MYH10 protein expression in platelets as a biomarker of RUNX1 and FLI1 alterations. *Blood* 120: 2719-2722

Auffray I, Marfatia S, de Jong K, Lee G, Huang CH, Paszty C, Tanner MJ, Mohandas N, Chasis JA (2001) Glycophorin A dimerization and band 3 interaction during erythroid membrane biogenesis: in vivo studies in human glycophorin A transgenic mice. *Blood* 97: 2872-2878

- Avellino R, Delwel R (2017) Expression and regulation of C/EBPalpha in normal myelopoiesis and in malignant transformation. *Blood* 129: 2083-2091
- Baldwin RM, Morettin A, Paris G, Goulet I, Cote J (2012) Alternatively spliced protein arginine methyltransferase 1 isoform PRMT1v2 promotes the survival and invasiveness of breast cancer cells. *Cell Cycle* 11: 4597-4612
- Bandyopadhyay S, Harris DP, Adams GN, Lause GE, McHugh A, Tillmaand EG, Money A, Willard B, Fox PL, Dicorleto PE (2012) HOXA9 methylation by PRMT5 is essential for endothelial cell expression of leukocyte adhesion molecules. *Mol Cell Biol* 32: 1202-1213
- Barreda DR, Belosevic M (2001) Transcriptional regulation of hemopoiesis. *Dev Comp Immunol* 25: 763-789
- Barski A, Cuddapah S, Cui K, Roh TY, Schones DE, Wang Z, Wei G, Chepelev I, Zhao K (2007) High-resolution profiling of histone methylations in the human genome. *Cell* 129: 823-837
- Bartfeld D, Shimon L, Couture GC, Rabinovich D, Frolov F, Levanon D, Groner Y, Shakked Z (2002) DNA recognition by the RUNX1 transcription factor is mediated by an allosteric transition in the RUNT domain and by DNA bending. *Structure* 10: 1395-1407
- Batta K, Menegatti S, Garcia-Alegria E, Florkowska M, Lacaud G, Kouskoff V (2016) Concise Review: Recent Advances in the In Vitro Derivation of Blood Cell Populations. *Stem Cells Transl Med* 5: 1330-1337
- Bedford MT, Clarke SG (2009) Protein arginine methylation in mammals: who, what, and why. *Mol Cell* 33: 1-13
- Bedford MT, Richard S (2005) Arginine methylation an emerging regulator of protein function. *Mol Cell* 18: 263-272
- Bejar R, Stevenson K, Abdel-Wahab O, Galili N, Nilsson B, Garcia-Manero G, Kantarjian H, Raza A, Levine RL, Neuberg D et al (2011) Clinical effect of point mutations in myelodysplastic syndromes. *N Engl J Med* 364: 2496-2506
- Besson A, Dowdy SF, Roberts JM (2008) CDK inhibitors: cell cycle regulators and beyond. *Dev Cell* 14: 159-169
- Blumenfeld OO, Huang CH (1995) Molecular genetics of the glycophorin gene family, the antigens for MNSs blood groups: multiple gene rearrangements and modulation of splice site usage result in extensive diversification. *Hum Mutat* 6: 199-209
- Bluteau D, Gilles L, Hilpert M, Antony-Debre I, James C, Debili N, Camara-Clayette V, Wagner-Ballon O, Cordette-Lagarde V, Robert T et al (2011) Down-regulation of the RUNX1-

target gene NR4A3 contributes to hematopoiesis deregulation in familial platelet disorder/acute myelogenous leukemia. *Blood* 118: 6310-6320

Bluteau D, Glembotsky AC, Raimbault A, Balayn N, Gilles L, Rameau P, Nurden P, Alessi MC, Debili N, Vainchenker W et al (2012) Dysmegakaryopoiesis of FPD/AML pedigrees with constitutional RUNX1 mutations is linked to myosin II deregulated expression. *Blood* 120: 2708-2718

Blyth K, Vaillant F, Jenkins A, McDonald L, Pringle MA, Huser C, Stein T, Neil J, Cameron ER (2010) Runx2 in normal tissues and cancer cells: A developing story. *Blood Cells Mol Dis* 45: 117-123

Boffa LC, Karn J, Vidali G, Allfrey VG (1977) Distribution of NG, NG,-dimethylarginine in nuclear protein fractions. *Biochem Biophys Res Commun* 74: 969-976

Bostick M, Kim JK, Esteve PO, Clark A, Pradhan S, Jacobsen SE (2007) UHRF1 plays a role in maintaining DNA methylation in mammalian cells. *Science* 317: 1760-1764

Boulanger MC, Liang C, Russell RS, Lin R, Bedford MT, Wainberg MA, Richard S (2005) Methylation of Tat by PRMT6 regulates human immunodeficiency virus type 1 gene expression. *J Virol* 79: 124-131

Bouras G, Deftereos S, Tousoulis D, Giannopoulos G, Chatzis G, Tsounis D, Cleman MW, Stefanadis C (2013) Asymmetric Dimethylarginine (ADMA): a promising biomarker for cardiovascular disease? *Curr Top Med Chem* 13: 180-200

Bowers EM, Yan G, Mukherjee C, Orry A, Wang L, Holbert MA, Crump NT, Hazzalin CA, Liszczak G, Yuan H et al (2010) Virtual ligand screening of the p300/CBP histone acetyltransferase: identification of a selective small molecule inhibitor. *Chem Biol* 17: 471-482

Brandt J, Briddell RA, Srour EF, Leemhuis TB, Hoffman R (1992) Role of c-kit ligand in the expansion of human hematopoietic progenitor cells. *Blood* 79: 634-641

Briddell RA, Brandt JE, Straneva JE, Srour EF, Hoffman R (1989) Characterization of the human burst-forming unit-megakaryocyte. *Blood* 74: 145-151

Bunn HF (2013) Erythropoietin. *Cold Spring Harb Perspect Med* 3: a011619

Bunn HF, Forget BG (1986) Hemoglobin--molecular, genetic, and clinical aspects: WB Saunders Co.

Bunting S, Widmer R, Lipari T, Rangell L, Steinmetz H, Carver-Moore K, Moore MW, Keller GA, de Sauvage FJ (1997) Normal platelets and megakaryocytes are produced in vivo in the absence of thrombopoietin. *Blood* 90: 3423-3429

- Cai Z, de Bruijn M, Ma X, Dortland B, Luteijn T, Downing RJ, Dzierzak E (2000) Haploinsufficiency of AML1 affects the temporal and spatial generation of hematopoietic stem cells in the mouse embryo. *Immunity* 13: 423-431
- Cameron S, Taylor DS, TePas EC, Speck NA, Mathey-Prevot B (1994) Identification of a critical regulatory site in the human interleukin-3 promoter by in vivo footprinting. *Blood* 83: 2851-2859
- Cantor AB, Orkin SH (2001) Hematopoietic development: a balancing act. *Curr Opin Genet Dev* 11: 513-519
- Cantor AB, Orkin SH (2002) Transcriptional regulation of erythropoiesis: an affair involving multiple partners. *Oncogene* 21: 3368-3376
- Cardozo T, Pagano M (2004) The SCF ubiquitin ligase: insights into a molecular machine. *Nat Rev Mol Cell Biol* 5: 739-751
- Carrell NA, Fitzgerald LA, Steiner B, Erickson HP, Phillips DR (1985) Structure of human platelet membrane glycoproteins IIb and IIIa as determined by electron microscopy. *J Biol Chem* 260: 1743-1749
- Casadio F, Lu X, Pollock SB, LeRoy G, Garcia BA, Muir TW, Roeder RG, Allis CD (2013) H3R42me2a is a histone modification with positive transcriptional effects. *Proc Natl Acad Sci U S A* 110: 14894-14899
- Cha B, Jho EH (2012) Protein arginine methyltransferases (PRMTs) as therapeutic targets. *Expert Opin Ther Targets* 16: 651-664
- Chakraborty S, Sinha KK, Senyuk V, Nucifora G (2003) SUV39H1 interacts with AML1 and abrogates AML1 transactivity. AML1 is methylated in vivo. *Oncogene* 22: 5229-5237
- Chan-Penebre E, Kuplast KG, Majer CR, Boriack-Sjodin PA, Wigle TJ, Johnston LD, Rioux N, Munchhof MJ, Jin L, Jacques SL et al (2015) A selective inhibitor of PRMT5 with in vivo and in vitro potency in MCL models. *Nat Chem Biol* 11: 432-437
- Chan EM, Comer EM, Brown FC, Richkind KE, Holmes ML, Chong BH, Shiffman R, Zhang DE, Slovak ML, Willman CL et al (2005) AML1-FOG2 fusion protein in myelodysplasia. *Blood* 105: 4523-4526
- Chang Y, Bluteau D, Debili N, Vainchenker W (2007) From hematopoietic stem cells to platelets. *J Thromb Haemost* 5 Suppl 1: 318-327
- Chen L, Willis SN, Wei A, Smith BJ, Fletcher JI, Hinds MG, Colman PM, Day CL, Adams JM, Huang DC (2005) Differential targeting of prosurvival Bcl-2 proteins by their BH3-only ligands allows complementary apoptotic function. *Mol Cell* 17: 393-403

- Cheng M, Olivier P, Diehl JA, Fero M, Roussel MF, Roberts JM, Sherr CJ (1999) The p21(Cip1) and p27(Kip1) CDK 'inhibitors' are essential activators of cyclin D-dependent kinases in murine fibroblasts. *EMBO J* 18: 1571-1583
- Chien A, Edgar DB, Trela JM (1976) Deoxyribonucleic acid polymerase from the extreme thermophile *Thermus aquaticus*. *J Bacteriol* 127: 1550-1557
- Coller BS (1990) Platelets and thrombolytic therapy. *N Engl J Med* 322: 33-42
- Cook JR, Lee JH, Yang ZH, Krause CD, Herth N, Hoffmann R, Pestka S (2006) FBXO11/PRMT9, a new protein arginine methyltransferase, symmetrically dimethylates arginine residues. *Biochem Biophys Res Commun* 342: 472-481
- Coqueret O (2003) New roles for p21 and p27 cell-cycle inhibitors: a function for each cell compartment? *Trends Cell Biol* 13: 65-70
- Couture JF, Collazo E, Trievel RC (2006) Molecular recognition of histone H3 by the WD40 protein WDR5. *Nat Struct Mol Biol* 13: 698-703
- Creyghton MP, Cheng AW, Welstead GG, Kooistra T, Carey BW, Steine EJ, Hanna J, Lodato MA, Frampton GM, Sharp PA et al (2010) Histone H3K27ac separates active from poised enhancers and predicts developmental state. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107: 21931-21936
- Cuthbert GL, Daujat S, Snowden AW, Erdjument-Bromage H, Hagiwara T, Yamada M, Schneider R, Gregory PD, Tempst P, Bannister AJ et al (2004) Histone deimination antagonizes arginine methylation. *Cell* 118: 545-553
- Cvetković T, Pavlović R, Đorđević V, Stojanović I, Veličković-Radovanović R, Ignjatović A, Stefanović N, Živanović S, Đorđević V (2012) Dimethylarginine–biomarkers in progression of kidney disease/Dimetilarginini–biomarkeri u progresiji bubrežnih oboljenja. *Journal of Medical Biochemistry* 31: 301-308
- de Bruijn M, Dzierzak E (2017) Runx transcription factors in the development and function of the definitive hematopoietic system. *Blood* 129: 2061-2069
- Dean L (2005) Blood Groups and Red Cell Antigens [Internet]. Bethesda (MD): National Center for Biotechnology Information (US); Chapter 2, Blood group antigens are surface markers on the red blood cell membrane.
- Debili N, Louache F, Vainchenker W (2004) Isolation and culture of megakaryocyte precursors. *Methods Mol Biol* 272: 293-308
- Demaision C, Parsley K, Brouns G, Scherr M, Battmer K, Kinnon C, Grez M, Thrasher AJ (2002) High-level transduction and gene expression in hematopoietic repopulating cells using

a human immunodeficiency [correction of imunodeficiency] virus type 1-based lentiviral vector containing an internal spleen focus forming virus promoter. *Hum Gene Ther* 13: 803-813

Denis H, Deplus R, Putmans P, Yamada M, Metivier R, Fuks F (2009) Functional connection between deimination and deacetylation of histones. *Mol Cell Biol* 29: 4982-4993

Deutsch VR, Tomer A (2006) Megakaryocyte development and platelet production. *Br J Haematol* 134: 453-466

Di Lorenzo A, Bedford MT (2011) Histone arginine methylation. *FEBS Lett* 585: 2024-2031

Dicker F, Haferlach C, Kern W, Haferlach T, Schnittger S (2007) Trisomy 13 is strongly associated with AML1/RUNX1 mutations and increased FLT3 expression in acute myeloid leukemia. *Blood* 110: 1308-1316

Ding Y, Harada Y, Imagawa J, Kimura A, Harada H (2009) AML1/RUNX1 point mutation possibly promotes leukemic transformation in myeloproliferative neoplasms. *Blood* 114: 5201-5205

Dong HY, Wilkes S, Yang H (2011) CD71 is selectively and ubiquitously expressed at high levels in erythroid precursors of all maturation stages: a comparative immunochemical study with glycophorin A and hemoglobin A. *Am J Surg Pathol* 35: 723-732

Downton SB, Beardsley D, Jamison D, Blattner S, Li FP (1985) Studies of a familial platelet disorder. *Blood* 65: 557-563

Drachman JG, Kaushansky K (1995) Structure and function of the cytokine receptor superfamily. *Curr Opin Hematol* 2: 22-28

Draper JE, Sroczynska P, Tsoulaki O, Leong HS, Fadlullah MZ, Miller C, Kouskoff V, Lacaud G (2016) RUNX1B Expression Is Highly Heterogeneous and Distinguishes Megakaryocytic and Erythroid Lineage Fate in Adult Mouse Hematopoiesis. *PLoS Genet* 12: e1005814

Du J, Patel DJ (2014) Structural biology-based insights into combinatorial readout and crosstalk among epigenetic marks. *Biochim Biophys Acta* 1839: 719-727

Durst KL, Hiebert SW (2004) Role of RUNX family members in transcriptional repression and gene silencing. *Oncogene* 23: 4220-4224

Dzierzak E, Philipsen S (2013) Erythropoiesis: development and differentiation. *Cold Spring Harb Perspect Med* 3: a011601

Dzierzak E, Speck NA (2008) Of lineage and legacy: the development of mammalian hematopoietic stem cells. *Nat Immunol* 9: 129-136

Easwaran H, Tsai HC, Baylin SB (2014) Cancer epigenetics: tumor heterogeneity, plasticity of stem-like states, and drug resistance. *Mol Cell* 54: 716-727

El-Andaloussi N, Valovka T, Toueille M, Steinacher R, Focke F, Gehrig P, Covic M, Hassa PO, Schar P, Hubscher U et al (2006) Arginine methylation regulates DNA polymerase beta. *Mol Cell* 22: 51-62

Elagib KE, Racke FK, Mogass M, Khetawat R, Delehanty LL, Goldfarb AN (2003) RUNX1 and GATA-1 coexpression and cooperation in megakaryocytic differentiation. *Blood* 101: 4333-4341

Elliott S, Pham E, Macdougall IC (2008) Erythropoietins: a common mechanism of action. *Exp Hematol* 36: 1573-1584

Elliott SG, Foote M, Molineux G (2009) Erythropoietins, erythropoietic factors, and erythropoiesis: molecular, cellular, preclinical, and clinical biology: Springer Science & Business Media

Eram MS, Shen Y, Szewczyk M, Wu H, Senisterra G, Li F, Butler KV, Kaniskan HU, Speed BA, Dela Sena C et al (2016) A Potent, Selective, and Cell-Active Inhibitor of Human Type I Protein Arginine Methyltransferases. *ACS Chem Biol* 11: 772-781

Farioli-Vecchioli S, Tanori M, Micheli L, Mancuso M, Leonardi L, Saran A, Ciotti MT, Ferretti E, Gulino A, Pazzaglia S et al (2007) Inhibition of medulloblastoma tumorigenesis by the antiproliferative and pro-differentiative gene PC3. *FASEB J* 21: 2215-2225

Fawcett DW, Jensh RP (1997) Bloom & Fawcett: concise histology: Chapman and Hall

Feng Y, Maity R, Whitelegge JP, Hadjikyriacou A, Li Z, Zurita-Lopez C, Al-Hadid Q, Clark AT, Bedford MT, Masson JY et al (2013) Mammalian protein arginine methyltransferase 7 (PRMT7) specifically targets RXR sites in lysine- and arginine-rich regions. *J Biol Chem* 288: 37010-37025

Ferreira R, Ohneda K, Yamamoto M, Philipsen S (2005) GATA1 function, a paradigm for transcription factors in hematopoiesis. *Mol Cell Biol* 25: 1215-1227

Fialkow PJ, Singer JW, Adamson JW, Vaidya K, Dow LW, Ochs J, Moohr JW (1981) Acute nonlymphocytic leukemia: heterogeneity of stem cell origin. *Blood* 57: 1068-1073

Fibach E, Manor D, Oppenheim A, Rachmilewitz EA (1989) Proliferation and maturation of human erythroid progenitors in liquid culture. *Blood* 73: 100-103

Fisher AL, Caudy M (1998) Groucho proteins: transcriptional corepressors for specific subsets of DNA-binding transcription factors in vertebrates and invertebrates. *Genes Dev* 12: 1931-1940

Fox N, Priestley G, Papayannopoulou T, Kaushansky K (2002) Thrombopoietin expands hematopoietic stem cells after transplantation. *J Clin Invest* 110: 389-394

Frankel A, Yadav N, Lee J, Branscombe TL, Clarke S, Bedford MT (2002) The novel human protein arginine N-methyltransferase PRMT6 is a nuclear enzyme displaying unique substrate specificity. *J Biol Chem* 277: 3537-3543

Freyssinier JM, Lecoq-Lafon C, Amsellem S, Picard F, Ducrocq R, Mayeux P, Lacombe C, Fichelson S (1999) Purification, amplification and characterization of a population of human erythroid progenitors. *Br J Haematol* 106: 912-922

Furumai R, Matsuyama A, Kobashi N, Lee KH, Nishiyama M, Nakajima H, Tanaka A, Komatsu Y, Nishino N, Yoshida M et al (2002) FK228 (depsipeptide) as a natural prodrug that inhibits class I histone deacetylases. *Cancer Res* 62: 4916-4921

Gallagher PG, Forget BG (1993) Spectrin genes in health and disease. *Semin Hematol* 30: 4-20

Gallagher PG, Tse WT, Coetzer T, Lecomte MC, Garbarz M, Zarkowsky HS, Baruchel A, Ballas SK, Dhermy D, Palek J et al (1992) A common type of the spectrin alpha I 46-50a-kD peptide abnormality in hereditary elliptocytosis and pyropoikilocytosis is associated with a mutation distant from the proteolytic cleavage site. Evidence for the functional importance of the triple helical model of spectrin. *J Clin Invest* 89: 892-898

Geddis AE, Fox NE, Tkachenko E, Kaushansky K (2007) Endomitotic megakaryocytes that form a bipolar spindle exhibit cleavage furrow ingression followed by furrow regression. *Cell Cycle* 6: 455-460

Geddis AE, Kaushansky K (2007) Immunology. The root of platelet production. *Science* 317: 1689-1691

Geisberg JV, Struhl K (2004) Quantitative sequential chromatin immunoprecipitation, a method for analyzing co-occupancy of proteins at genomic regions in vivo. *Nucleic acids research* 32: e151

Geminard C, de Gassart A, Vidal M (2002) Reticulocyte maturation: mitoptosis and exosome release. *Biocell* 26: 205-215

Gilles L, Guieze R, Bluteau D, Cordette-Lagarde V, Lacout C, Favier R, Larbret F, Debili N, Vainchenker W, Raslova H (2008) P19INK4D links endomitotic arrest and megakaryocyte maturation and is regulated by AML-1. *Blood* 111: 4081-4091

Goldberg AD, Allis CD, Bernstein E (2007) Epigenetics: a landscape takes shape. *Cell* 128: 635-638

- Goldfarb AN (2007) Transcriptional control of megakaryocyte development. *Oncogene* 26: 6795-6802
- Goldfarb AN (2009) Megakaryocytic programming by a transcriptional regulatory loop: A circle connecting RUNX1, GATA-1, and P-TEFb. *J Cell Biochem* 107: 377-382
- Golub TR, Barker GF, Bohlander SK, Hiebert SW, Ward DC, Bray-Ward P, Morgan E, Raimondi SC, Rowley JD, Gilliland DG (1995) Fusion of the TEL gene on 12p13 to the AML1 gene on 21q22 in acute lymphoblastic leukemia. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92: 4917-4921
- Goode DK, Obier N, Vijayabaskar MS, Lie ALM, Lilly AJ, Hannah R, Lichtinger M, Batta K, Florkowska M, Patel R et al (2016) Dynamic Gene Regulatory Networks Drive Hematopoietic Specification and Differentiation. *Dev Cell* 36: 572-587
- Greenblatt SM, Liu F, Nimer SD (2016) Arginine methyltransferases in normal and malignant hematopoiesis. *Exp Hematol* 44: 435-441
- Growney JD, Shigematsu H, Li Z, Lee BH, Adelsperger J, Rowan R, Curley DP, Kutok JL, Akashi K, Williams IR et al (2005) Loss of Runx1 perturbs adult hematopoiesis and is associated with a myeloproliferative phenotype. *Blood* 106: 494-504
- Guardavaccaro D, Corrente G, Covone F, Micheli L, D'Agnano I, Starace G, Caruso M, Tirone F (2000) Arrest of G(1)-S progression by the p53-inducible gene PC3 is Rb dependent and relies on the inhibition of cyclin D1 transcription. *Mol Cell Biol* 20: 1797-1815
- Guccione E, Bassi C, Casadio F, Martinato F, Cesaroni M, Schuchlantz H, Luscher B, Amati B (2007) Methylation of histone H3R2 by PRMT6 and H3K4 by an MLL complex are mutually exclusive. *Nature* 449: 933-937
- Guccione E, Martinato F, Finocchiaro G, Luzi L, Tizzoni L, Dall' Olio V, Zardo G, Nervi C, Bernard L, Amati B (2006) Myc-binding-site recognition in the human genome is determined by chromatin context. *Nat Cell Biol* 8: 764-770
- Guo H, Friedman AD (2011) Phosphorylation of RUNX1 by cyclin-dependent kinase reduces direct interaction with HDAC1 and HDAC3. *J Biol Chem* 286: 208-215
- Gurney AL, Carver-Moore K, de Sauvage FJ, Moore MW (1994) Thrombocytopenia in c-mpl-deficient mice. *Science* 265: 1445-1447
- Hagiwara T, Nakashima K, Hirano H, Senshu T, Yamada M (2002) Deimination of arginine residues in nucleophosmin/B23 and histones in HL-60 granulocytes. *Biochem Biophys Res Commun* 290: 979-983
- Hall MA, Curtis DJ, Metcalf D, Elefanty AG, Sourris K, Robb L, Gothert JR, Jane SM, Begley CG (2003) The critical regulator of embryonic hematopoiesis, SCL, is vital in the adult for

megakaryopoiesis, erythropoiesis, and lineage choice in CFU-S12. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100: 992-997

Han HS, Jung CY, Yoon YS, Choi S, Choi D, Kang G, Park KG, Kim ST, Koo SH (2014) Arginine methylation of CRTC2 is critical in the transcriptional control of hepatic glucose metabolism. *Sci Signal* 7: ra19

Harada Y, Harada H (2009) Molecular pathways mediating MDS/AML with focus on AML1/RUNX1 point mutations. *J Cell Physiol* 220: 16-20

Harrison MJ, Tang YH, Dowhan DH (2010) Protein arginine methyltransferase 6 regulates multiple aspects of gene expression. *Nucleic acids research* 38: 2201-2216

Heerboth S, Lapinska K, Snyder N, Leary M, Rollinson S, Sarkar S (2014) Use of epigenetic drugs in disease: an overview. *Genet Epigenet* 6: 9-19

Henry MF, Silver PA (1996) A novel methyltransferase (Hmt1p) modifies poly(A)⁺-RNA-binding proteins. *Mol Cell Biol* 16: 3668-3678

Herglotz J, Kuvardina ON, Kolodziej S, Kumar A, Hussong H, Grez M, Lausen J (2013) Histone arginine methylation keeps RUNX1 target genes in an intermediate state. *Oncogene* 32: 2565-2575

Herkt SC, Kuvardina ON, Herglotz J, Schneider L, Meyer A, Pommerenke C, Salinas-Riester G, Seifried E, Bonig H, Lausen J (2017) Protein arginine methyltransferase 6 controls erythroid gene expression and differentiation of human CD34⁺ progenitor cells. *Haematologica*

Hodohara K, Fujii N, Yamamoto N, Kaushansky K (2000) Stromal cell-derived factor-1 (SDF-1) acts together with thrombopoietin to enhance the development of megakaryocytic progenitor cells (CFU-MK). *Blood* 95: 769-775

Hou CL, Tang C, Roffler SR, Tang TK (2000) Protein 4.1R binding to eIF3-p44 suggests an interaction between the cytoskeletal network and the translation apparatus. *Blood* 96: 747-753

Huang da W, Sherman BT, Lempicki RA (2009a) Bioinformatics enrichment tools: paths toward the comprehensive functional analysis of large gene lists. *Nucleic acids research* 37: 1-13

Huang da W, Sherman BT, Lempicki RA (2009b) Systematic and integrative analysis of large gene lists using DAVID bioinformatics resources. *Nat Protoc* 4: 44-57

Huang da W, Sherman BT, Zheng X, Yang J, Imamichi T, Stephens R, Lempicki RA (2009c) Extracting biological meaning from large gene lists with DAVID. *Curr Protoc Bioinformatics* Chapter 13: Unit 13 11

- Huang G, Zhang P, Hirai H, Elf S, Yan X, Chen Z, Koschmieder S, Okuno Y, Dayaram T, Gowney JD et al (2008) PU.1 is a major downstream target of AML1 (RUNX1) in adult mouse hematopoiesis. *Nat Genet* 40: 51-60
- Huang H, Cantor AB (2009) Common features of megakaryocytes and hematopoietic stem cells: what's the connection? *J Cell Biochem* 107: 857-864
- Huang H, Woo AJ, Waldon Z, Schindler Y, Moran TB, Zhu HH, Feng GS, Steen H, Cantor AB (2012) A Src family kinase-Shp2 axis controls RUNX1 activity in megakaryocyte and T-lymphocyte differentiation. *Genes Dev* 26: 1587-1601
- Hughes RM, Waters ML (2006) Arginine methylation in a beta-hairpin peptide: implications for Arg-pi interactions, DeltaCp(o), and the cold denatured state. *J Am Chem Soc* 128: 12735-12742
- Hung LY, Tang CJ, Tang TK (2000) Protein 4.1 R-135 interacts with a novel centrosomal protein (CPAP) which is associated with the gamma-tubulin complex. *Mol Cell Biol* 20: 7813-7825
- Hyllus D, Stein C, Schnabel K, Schiltz E, Imhof A, Dou Y, Hsieh J, Bauer UM (2007) PRMT6-mediated methylation of R2 in histone H3 antagonizes H3 K4 trimethylation. *Genes Dev* 21: 3369-3380
- Iberg AN, Espejo A, Cheng D, Kim D, Michaud-Levesque J, Richard S, Bedford MT (2008) Arginine methylation of the histone H3 tail impedes effector binding. *J Biol Chem* 283: 3006-3010
- Ichikawa M, Asai T, Saito T, Seo S, Yamazaki I, Yamagata T, Mitani K, Chiba S, Ogawa S, Kurokawa M et al (2004) AML-1 is required for megakaryocytic maturation and lymphocytic differentiation, but not for maintenance of hematopoietic stem cells in adult hematopoiesis. *Nat Med* 10: 299-304
- Imai Y, Kurokawa M, Izutsu K, Hangaishi A, Takeuchi K, Maki K, Ogawa S, Chiba S, Mitani K, Hirai H (2000) Mutations of the AML1 gene in myelodysplastic syndrome and their functional implications in leukemogenesis. *Blood* 96: 3154-3160
- Imai Y, Kurokawa M, Yamaguchi Y, Izutsu K, Nitta E, Mitani K, Satake M, Noda T, Ito Y, Hirai H (2004) The corepressor mSin3A regulates phosphorylation-induced activation, intranuclear location, and stability of AML1. *Mol Cell Biol* 24: 1033-1043
- Italiano JE, Jr., Stewart M, Roberts TM (1999) Localized depolymerization of the major sperm protein cytoskeleton correlates with the forward movement of the cell body in the amoeboid movement of nematode sperm. *J Cell Biol* 146: 1087-1096
- Jackson CW (1990) Megakaryocyte endomitosis: a review. *Int J Cell Cloning* 8: 224-226

- Jansson M, Durant ST, Cho EC, Sheahan S, Edelmann M, Kessler B, La Thangue NB (2008) Arginine methylation regulates the p53 response. *Nat Cell Biol* 10: 1431-1439
- Javed A, Guo B, Hiebert S, Choi JY, Green J, Zhao SC, Osborne MA, Stifani S, Stein JL, Lian JB et al (2000) Groucho/TLE/R-esp proteins associate with the nuclear matrix and repress RUNX (CBF(alpha)/AML/PEBP2(alpha)) dependent activation of tissue-specific gene transcription. *J Cell Sci* 113 (Pt 12): 2221-2231
- Jelkmann W (2004) Molecular biology of erythropoietin. *Intern Med* 43: 649-659
- Jentoft N (1990) Why are proteins O-glycosylated? *Trends Biochem Sci* 15: 291-294
- Jeong SJ, Lu H, Cho WK, Park HU, Pise-Masison C, Brady JN (2006) Coactivator-associated arginine methyltransferase 1 enhances transcriptional activity of the human T-cell lymphotropic virus type 1 long terminal repeat through direct interaction with Tax. *J Virol* 80: 10036-10044
- Kamachi Y, Ogawa E, Asano M, Ishida S, Murakami Y, Satake M, Ito Y, Shigesada K (1990) Purification of a mouse nuclear factor that binds to both the A and B cores of the polyomavirus enhancer. *J Virol* 64: 4808-4819
- Kaniskan HU, Konze KD, Jin J (2015) Selective inhibitors of protein methyltransferases. *J Med Chem* 58: 1596-1629
- Katz JE, Dlakic M, Clarke S (2003) Automated identification of putative methyltransferases from genomic open reading frames. *Mol Cell Proteomics* 2: 525-540
- Kaur G, Jalagadugula G, Mao G, Rao AK (2010) RUNX1/core binding factor A2 regulates platelet 12-lipoxygenase gene (ALOX12): studies in human RUNX1 haplodeficiency. *Blood* 115: 3128-3135
- Kaushansky K (1999) The enigmatic megakaryocyte gradually reveals its secrets. *Bioessays* 21: 353-360
- Kaushansky K (2008) Historical review: megakaryopoiesis and thrombopoiesis. *Blood* 111: 981-986
- Kaushansky K, Lok S, Holly RD, Broudy VC, Lin N, Bailey MC, Forstrom JW, Buddle MM, Oort PJ, Hagen FS et al (1994) Promotion of megakaryocyte progenitor expansion and differentiation by the c-Mpl ligand thrombopoietin. *Nature* 369: 568-571
- Kelly TK, De Carvalho DD, Jones PA (2010) Epigenetic modifications as therapeutic targets. *Nat Biotechnol* 28: 1069-1078

- Kent WJ, Sugnet CW, Furey TS, Roskin KM, Pringle TH, Zahler AM, Haussler D (2002) The human genome browser at UCSC. *Genome Res* 12: 996-1006
- Khanna R, Chang SH, Andrabi S, Azam M, Kim A, Rivera A, Brugnara C, Low PS, Liu SC, Chishti AH (2002) Headpiece domain of dematin is required for the stability of the erythrocyte membrane. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99: 6637-6642
- Kikuchi J, Furukawa Y, Iwase S, Terui Y, Nakamura M, Kitagawa S, Kitagawa M, Komatsu N, Miura Y (1997) Polyploidization and functional maturation are two distinct processes during megakaryocytic differentiation: involvement of cyclin-dependent kinase inhibitor p21 in polyploidization. *Blood* 89: 3980-3990
- Kim CH (2010) Homeostatic and pathogenic extramedullary hematopoiesis. *J Blood Med* 1: 13-19
- Kim J, Guermah M, McGinty RK, Lee JS, Tang Z, Milne TA, Shilatfard A, Muir TW, Roeder RG (2009) RAD6-Mediated transcription-coupled H2B ubiquitylation directly stimulates H3K4 methylation in human cells. *Cell* 137: 459-471
- Kirito K, Kaushansky K (2006) Transcriptional regulation of megakaryopoiesis: thrombopoietin signaling and nuclear factors. *Curr Opin Hematol* 13: 151-156
- Kitabayashi I, Yokoyama A, Shimizu K, Ohki M (1998) Interaction and functional cooperation of the leukemia-associated factors AML1 and p300 in myeloid cell differentiation. *EMBO J* 17: 2994-3004
- Kleinschmidt MA, de Graaf P, van Teeffelen HA, Timmers HT (2012) Cell cycle regulation by the PRMT6 arginine methyltransferase through repression of cyclin-dependent kinase inhibitors. *PLoS One* 7: e41446
- Klimchenko O, Mori M, Distefano A, Langlois T, Larbret F, Lecluse Y, Feraud O, Vainchenker W, Norol F, Debili N (2009) A common bipotent progenitor generates the erythroid and megakaryocyte lineages in embryonic stem cell-derived primitive hematopoiesis. *Blood* 114: 1506-1517
- Knapp W, Strobl H, Scheinecker C, Bello-Fernandez C, Majdic O (1995) Molecular characterization of CD34+ human hematopoietic progenitor cells. *Ann Hematol* 70: 281-296
- Koch CM, Andrews RM, Flicek P, Dillon SC, Karaoz U, Clelland GK, Wilcox S, Beare DM, Fowler JC, Couttet P et al (2007) The landscape of histone modifications across 1% of the human genome in five human cell lines. *Genome Res* 17: 691-707
- Kohrs N, Kolodziej S, Kuvardina ON, Herglotz J, Yillah J, Herkt S, Piechatzek A, Salinas Riestor G, Lingner T, Wichmann C et al (2016) MiR144/451 Expression Is Repressed by RUNX1 During Megakaryopoiesis and Disturbed by RUNX1/ETO. *PLoS Genet* 12: e1005946

- Kohzaki H, Ito K, Huang G, Wee HJ, Murakami Y, Ito Y (1999) Block of granulocytic differentiation of 32Dcl3 cells by AML1/ETO(MTG8) but not by highly expressed Bcl-2. *Oncogene* 18: 4055-4062
- Kolodziej S, Kuvardina ON, Oellerich T, Herglotz J, Backert I, Kohrs N, Buscato E, Wittmann SK, Salinas-Riester G, Bonig H et al (2014) PADI4 acts as a coactivator of Tal1 by counteracting repressive histone arginine methylation. *Nat Commun* 5: 3995
- Komori T, Yagi H, Nomura S, Yamaguchi A, Sasaki K, Deguchi K, Shimizu Y, Bronson RT, Gao YH, Inada M et al (1997) Targeted disruption of Cbfa1 results in a complete lack of bone formation owing to maturational arrest of osteoblasts. *Cell* 89: 755-764
- Kondo M, Wagers AJ, Manz MG, Prohaska SS, Scherer DC, Beilhack GF, Shizuru JA, Weissman IL (2003) Biology of hematopoietic stem cells and progenitors: implications for clinical application. *Annu Rev Immunol* 21: 759-806
- Koulis M, Pop R, Porpiglia E, Shearstone JR, Hidalgo D, Socolovsky M (2011) Identification and analysis of mouse erythroid progenitors using the CD71/TER119 flow-cytometric assay. *J Vis Exp*
- Koury MJ, Sawyer ST, Brandt SJ (2002) New insights into erythropoiesis. *Curr Opin Hematol* 9: 93-100
- Kouzarides T (2007) Chromatin modifications and their function. *Cell* 128: 693-705
- Krause CD, Yang ZH, Kim YS, Lee JH, Cook JR, Pestka S (2007) Protein arginine methyltransferases: evolution and assessment of their pharmacological and therapeutic potential. *Pharmacol Ther* 113: 50-87
- Krzyzanowska K, Mittermayer F, Wolzt M, Schernthaner G (2008) ADMA, cardiovascular disease and diabetes. *Diabetes Res Clin Pract* 82 Suppl 2: S122-126
- Kuo MC, Liang DC, Huang CF, Shih YS, Wu JH, Lin TL, Shih LY (2009) RUNX1 mutations are frequent in chronic myelomonocytic leukemia and mutations at the C-terminal region might predict acute myeloid leukemia transformation. *Leukemia* 23: 1426-1431
- Kuvardina ON, Herglotz J, Kolodziej S, Kohrs N, Herkt S, Wojcik B, Oellerich T, Corso J, Behrens K, Kumar A et al (2015) RUNX1 represses the erythroid gene expression program during megakaryocytic differentiation. *Blood* 125: 3570-3579
- Lahlil R, Lecuyer E, Herblot S, Hoang T (2004) SCL assembles a multifactorial complex that determines glycophorin A expression. *Mol Cell Biol* 24: 1439-1452

- Lalle M, Curra C, Ciccarone F, Pace T, Cecchetti S, Fantozzi L, Ay B, Breton CB, Ponzi M (2011) Dematin, a component of the erythrocyte membrane skeleton, is internalized by the malaria parasite and associates with Plasmodium 14-3-3. *J Biol Chem* 286: 1227-1236
- Lancrin C, Mazan M, Stefanska M, Patel R, Lichtinger M, Costa G, Vargel O, Wilson NK, Moroy T, Bonifer C et al (2012) GFI1 and GFI1B control the loss of endothelial identity of hemogenic endothelium during hematopoietic commitment. *Blood* 120: 314-322
- Lancrin C, Sroczynska P, Stephenson C, Allen T, Kouskoff V, Lacaud G (2009) The haemangioblast generates haematopoietic cells through a haemogenic endothelium stage. *Nature* 457: 892-895
- Lausen J (2013) Contributions of the histone arginine methyltransferase PRMT6 to the epigenetic function of RUNX1. *Crit Rev Eukaryot Gene Expr* 23: 265-274
- Lauzurica P, Zhong XP, Krangel MS, Roberts JL (1997) Regulation of T cell receptor delta gene rearrangement by CBF/PEBP2. *J Exp Med* 185: 1193-1201
- Lee HW, Kim S, Paik WK (1977) S-adenosylmethionine: protein-arginine methyltransferase. Purification and mechanism of the enzyme. *Biochemistry* 16: 78-85
- Lee J, Sayegh J, Daniel J, Clarke S, Bedford MT (2005) PRMT8, a new membrane-bound tissue-specific member of the protein arginine methyltransferase family. *J Biol Chem* 280: 32890-32896
- Lee JS, Shukla A, Schneider J, Swanson SK, Washburn MP, Florens L, Bhaumik SR, Shilatifard A (2007) Histone crosstalk between H2B monoubiquitination and H3 methylation mediated by COMPASS. *Cell* 131: 1084-1096
- Lee YH, Ma H, Tan TZ, Ng SS, Soong R, Mori S, Fu XY, Zernicka-Goetz M, Wu Q (2012) Protein arginine methyltransferase 6 regulates embryonic stem cell identity. *Stem Cells Dev* 21: 2613-2622
- Lei K, Davis RJ (2003) JNK phosphorylation of Bim-related members of the Bcl2 family induces Bax-dependent apoptosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100: 2432-2437
- Levanon D, Bettoun D, Harris-Cerruti C, Woolf E, Negreanu V, Eilam R, Bernstein Y, Goldenberg D, Xiao C, Fliegau M et al (2002) The Runx3 transcription factor regulates development and survival of TrkC dorsal root ganglia neurons. *EMBO J* 21: 3454-3463
- Levanon D, Groner Y (2004) Structure and regulated expression of mammalian RUNX genes. *Oncogene* 23: 4211-4219
- Li E (2002) Chromatin modification and epigenetic reprogramming in mammalian development. *Nat Rev Genet* 3: 662-673

Li P, Yao H, Zhang Z, Li M, Luo Y, Thompson PR, Gilmour DS, Wang Y (2008) Regulation of p53 target gene expression by peptidylarginine deiminase 4. *Mol Cell Biol* 28: 4745-4758

Liakhovitskaia A, Lana-Elola E, Stamateris E, Rice DP, van 't Hof RJ, Medvinsky A (2010) The essential requirement for Runx1 in the development of the sternum. *Dev Biol* 340: 539-546

Liao HW, Hsu JM, Xia W, Wang HL, Wang YN, Chang WC, Arold ST, Chou CK, Tsou PH, Yamaguchi H et al (2015) PRMT1-mediated methylation of the EGF receptor regulates signaling and cetuximab response. *J Clin Invest* 125: 4529-4543

Lin WJ, Gary JD, Yang MC, Clarke S, Herschman HR (1996) The mammalian immediate-early TIS21 protein and the leukemia-associated BTG1 protein interact with a protein-arginine N-methyltransferase. *J Biol Chem* 271: 15034-15044

Litt M, Qiu Y, Huang S (2009) Histone arginine methylations: their roles in chromatin dynamics and transcriptional regulation. *Biosci Rep* 29: 131-141

Liu F, Zhao X, Perna F, Wang L, Koppikar P, Abdel-Wahab O, Harr MW, Levine RL, Xu H, Tefferi A et al (2011) JAK2V617F-mediated phosphorylation of PRMT5 downregulates its methyltransferase activity and promotes myeloproliferation. *Cancer Cell* 19: 283-294

Liu M, Lee MH, Cohen M, Bommakanti M, Freedman LP (1996) Transcriptional activation of the Cdk inhibitor p21 by vitamin D3 leads to the induced differentiation of the myelomonocytic cell line U937. *Genes Dev* 10: 142-153

Loken MR, Civin CI, Bigbee WL, Langlois RG, Jensen RH (1987a) Coordinate glycosylation and cell surface expression of glycophorin A during normal human erythropoiesis. *Blood* 70: 1959-1961

Loken MR, Shah VO, Dattilio KL, Civin CI (1987b) Flow cytometric analysis of human bone marrow. II. Normal B lymphocyte development. *Blood* 70: 1316-1324

Lordier L, Bluteau D, Jalil A, Legrand C, Pan J, Rameau P, Jouni D, Bluteau O, Mercher T, Leon C et al (2012) RUNX1-induced silencing of non-muscle myosin heavy chain IIB contributes to megakaryocyte polyploidization. *Nat Commun* 3: 717

Lorsbach RB, Moore J, Ang SO, Sun W, Lenny N, Downing JR (2004) Role of RUNX1 in adult hematopoiesis: analysis of RUNX1-IRES-GFP knock-in mice reveals differential lineage expression. *Blood* 103: 2522-2529

Lotem J, Levanon D, Negreanu V, Bauer O, Hantisteanu S, Dicken J, Groner Y (2015) Runx3 at the interface of immunity, inflammation and cancer. *Biochim Biophys Acta* 1855: 131-143

Luger K, Mader AW, Richmond RK, Sargent DF, Richmond TJ (1997) Crystal structure of the nucleosome core particle at 2.8 Å resolution. *Nature* 389: 251-260

Luger K, Richmond TJ (1998) The histone tails of the nucleosome. *Curr Opin Genet Dev* 8: 140-146

Luis TC, Killmann NM, Staal FJ (2012) Signal transduction pathways regulating hematopoietic stem cell biology: introduction to a series of Spotlight Reviews. *Leukemia* 26: 86-90

Lutterbach B, Hiebert SW (2000) Role of the transcription factor AML-1 in acute leukemia and hematopoietic differentiation. *Gene* 245: 223-235

Machlus KR, Thon JN, Italiano JE, Jr. (2014) Interpreting the developmental dance of the megakaryocyte: a review of the cellular and molecular processes mediating platelet formation. *Br J Haematol* 165: 227-236

Mainprize TG, Taylor MD, Rutka JT, Dirks PB (2001) Cip/Kip cell-cycle inhibitors: a neuro-oncological perspective. *J Neurooncol* 51: 205-218

Mann BS, Johnson JR, Cohen MH, Justice R, Pazdur R (2007) FDA approval summary: vorinostat for treatment of advanced primary cutaneous T-cell lymphoma. *Oncologist* 12: 1247-1252

Marks PA, Xu WS (2009) Histone deacetylase inhibitors: Potential in cancer therapy. *J Cell Biochem* 107: 600-608

Marsee DK, Pinkus GS, Yu H (2010) CD71 (transferrin receptor): an effective marker for erythroid precursors in bone marrow biopsy specimens. *Am J Clin Pathol* 134: 429-435

Maston GA, Evans SK, Green MR (2006) Transcriptional regulatory elements in the human genome. *Annu Rev Genomics Hum Genet* 7: 29-59

Mathioudaki K, Papadokostopoulou A, Scorilas A, Xynopoulos D, Agnanti N, Talieri M (2008) The PRMT1 gene expression pattern in colon cancer. *Br J Cancer* 99: 2094-2099

Matsumura I, Ishikawa J, Nakajima K, Oritani K, Tomiyama Y, Miyagawa J, Kato T, Miyazaki H, Matsuzawa Y, Kanakura Y (1997) Thrombopoietin-induced differentiation of a human megakaryoblastic leukemia cell line, CMK, involves transcriptional activation of p21(WAF1/Cip1) by STAT5. *Mol Cell Biol* 17: 2933-2943

Meaney MJ, Ferguson-Smith AC (2010) Epigenetic regulation of the neural transcriptome: the meaning of the marks. *Nat Neurosci* 13: 1313-1318

Medvinsky A, Dzierzak E (1996) Definitive hematopoiesis is autonomously initiated by the AGM region. *Cell* 86: 897-906

Merino G, van Herwaarden AE, Wagenaar E, Jonker JW, Schinkel AH (2005) Sex-dependent expression and activity of the ATP-binding cassette transporter breast cancer resistance protein (BCRP/ABCG2) in liver. *Mol Pharmacol* 67: 1765-1771

Meyers S, Lenny N, Hiebert SW (1995) The t(8;21) fusion protein interferes with AML-1B-dependent transcriptional activation. *Mol Cell Biol* 15: 1974-1982

Michaud-Levesque J, Richard S (2009) Thrombospondin-1 is a transcriptional repression target of PRMT6. *J Biol Chem* 284: 21338-21346

Michaud J, Scott HS, Escher R (2003) AML1 interconnected pathways of leukemogenesis. *Cancer Invest* 21: 105-136

Mikhail FM, Serry KA, Hatem N, Mourad ZI, Farawela HM, El Kaffash DM, Coignet L, Nucifora G (2002) AML1 gene over-expression in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia* 16: 658-668

Mikkola HK, Klintman J, Yang H, Hock H, Schlaeger TM, Fujiwara Y, Orkin SH (2003) Haematopoietic stem cells retain long-term repopulating activity and multipotency in the absence of stem-cell leukaemia SCL/tal-1 gene. *Nature* 421: 547-551

Mikkola HK, Orkin SH (2006) The journey of developing hematopoietic stem cells. *Development* 133: 3733-3744

Miranda TB, Miranda M, Frankel A, Clarke S (2004) PRMT7 is a member of the protein arginine methyltransferase family with a distinct substrate specificity. *J Biol Chem* 279: 22902-22907

Miranda TB, Webb KJ, Edberg DD, Reeves R, Clarke S (2005) Protein arginine methyltransferase 6 specifically methylates the nonhistone chromatin protein HMGA1a. *Biochem Biophys Res Commun* 336: 831-835

Mitchell LH, Drew AE, Ribich SA, Rioux N, Swinger KK, Jacques SL, Lingaraj T, Boriack-Sjodin PA, Waters NJ, Wigle TJ et al (2015) Aryl Pyrazoles as Potent Inhibitors of Arginine Methyltransferases: Identification of the First PRMT6 Tool Compound. *ACS Med Chem Lett* 6: 655-659

Miyamoto T, Iwasaki H, Reizis B, Ye M, Graf T, Weissman IL, Akashi K (2002) Myeloid or lymphoid promiscuity as a critical step in hematopoietic lineage commitment. *Dev Cell* 3: 137-147

- Miyoshi H, Ohira M, Shimizu K, Mitani K, Hirai H, Imai T, Yokoyama K, Soeda E, Ohki M (1995) Alternative splicing and genomic structure of the AML1 gene involved in acute myeloid leukemia. *Nucleic acids research* 23: 2762-2769
- Miyoshi H, Shimizu K, Kozu T, Maseki N, Kaneko Y, Ohki M (1991) t(8;21) breakpoints on chromosome 21 in acute myeloid leukemia are clustered within a limited region of a single gene, AML1. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88: 10431-10434
- Montagnoli A, Guardavaccaro D, Starace G, Tirone F (1996) Overexpression of the nerve growth factor-inducible PC3 immediate early gene is associated with growth inhibition. *Cell Growth Differ* 7: 1327-1336
- Munoz-Alonso MJ, Acosta JC, Richard C, Delgado MD, Sedivy J, Leon J (2005) p21Cip1 and p27Kip1 induce distinct cell cycle effects and differentiation programs in myeloid leukemia cells. *J Biol Chem* 280: 18120-18129
- Muto A, Kizaki M, Yamato K, Kawai Y, Kamata-Matsushita M, Ueno H, Ohguchi M, Nishihara T, Koeffler HP, Ikeda Y (1999) 1,25-Dihydroxyvitamin D3 induces differentiation of a retinoic acid-resistant acute promyelocytic leukemia cell line (UF-1) associated with expression of p21(WAF1/CIP1) and p27(KIP1). *Blood* 93: 2225-2233
- Najbauer J, Johnson BA, Young AL, Aswad DW (1993) Peptides with sequences similar to glycine, arginine-rich motifs in proteins interacting with RNA are efficiently recognized by methyltransferase(s) modifying arginine in numerous proteins. *J Biol Chem* 268: 10501-10509
- Nayak KB, Kuila N, Das Mohapatra A, Panda AK, Chakraborty S (2013) EVI1 targets DeltaNp63 and upregulates the cyclin dependent kinase inhibitor p21 independent of p53 to delay cell cycle progression and cell proliferation in colon cancer cells. *Int J Biochem Cell Biol* 45: 1568-1576
- Neault M, Mallette FA, Vogel G, Michaud-Levesque J, Richard S (2012) Ablation of PRMT6 reveals a role as a negative transcriptional regulator of the p53 tumor suppressor. *Nucleic acids research* 40: 9513-9521
- Nicholson TB, Chen T, Richard S (2009) The physiological and pathophysiological role of PRMT1-mediated protein arginine methylation. *Pharmacol Res* 60: 466-474
- Niki M, Okada H, Takano H, Kuno J, Tani K, Hibino H, Asano S, Ito Y, Satake M, Noda T (1997) Hematopoiesis in the fetal liver is impaired by targeted mutagenesis of a gene encoding a non-DNA binding subunit of the transcription factor, polyomavirus enhancer binding protein 2/core binding factor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94: 5697-5702
- North T, Gu TL, Stacy T, Wang Q, Howard L, Binder M, Marin-Padilla M, Speck NA (1999) Cbfa2 is required for the formation of intra-aortic hematopoietic clusters. *Development* 126: 2563-2575

North TE, Stacy T, Matheny CJ, Speck NA, de Bruijn MF (2004) Runx1 is expressed in adult mouse hematopoietic stem cells and differentiating myeloid and lymphoid cells, but not in maturing erythroid cells. *Stem Cells* 22: 158-168

Nuchprayoon I, Meyers S, Scott LM, Suzow J, Hiebert S, Friedman AD (1994) PEBP2/CBF, the murine homolog of the human myeloid AML1 and PEBP2 beta/CBF beta proto-oncoproteins, regulates the murine myeloperoxidase and neutrophil elastase genes in immature myeloid cells. *Mol Cell Biol* 14: 5558-5568

Oakford PC, James SR, Qadi A, West AC, Ray SN, Bert AG, Cockerill PN, Holloway AF (2010) Transcriptional and epigenetic regulation of the GM-CSF promoter by RUNX1. *Leuk Res* 34: 1203-1213

Ogawa E, Maruyama M, Kagoshima H, Inuzuka M, Lu J, Satake M, Shigesada K, Ito Y (1993a) PEBP2/PEA2 represents a family of transcription factors homologous to the products of the *Drosophila runt* gene and the human AML1 gene. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90: 6859-6863

Ogawa M, Nishikawa S, Yoshinaga K, Hayashi S, Kunisada T, Nakao J, Kina T, Sudo T, Kodama H, Nishikawa S (1993b) Expression and function of c-Kit in fetal hemopoietic progenitor cells: transition from the early c-Kit-independent to the late c-Kit-dependent wave of hemopoiesis in the murine embryo. *Development* 117: 1089-1098

Okita K, Yamanaka S (2011) Induced pluripotent stem cells: opportunities and challenges. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 366: 2198-2207

Okuda T, van Deursen J, Hiebert SW, Grosveld G, Downing JR (1996) AML1, the target of multiple chromosomal translocations in human leukemia, is essential for normal fetal liver hematopoiesis. *Cell* 84: 321-330

Olivier E, Qiu C, Bouhassira EE (2012) Novel, high-yield red blood cell production methods from CD34-positive cells derived from human embryonic stem, yolk sac, fetal liver, cord blood, and peripheral blood. *Stem Cells Transl Med* 1: 604-614

Olivier EN, Marenah L, McCahill A, Condie A, Cowan S, Mountford JC (2016) High-Efficiency Serum-Free Feeder-Free Erythroid Differentiation of Human Pluripotent Stem Cells Using Small Molecules. *Stem Cells Transl Med* 5: 1394-1405

Orkin SH (2000) Diversification of haematopoietic stem cells to specific lineages. *Nat Rev Genet* 1: 57-64

Orkin SH, Zon LI (2008) Hematopoiesis: an evolving paradigm for stem cell biology. *Cell* 132: 631-644

Osato M, Asou N, Abdalla E, Hoshino K, Yamasaki H, Okubo T, Suzushima H, Takatsuki K, Kanno T, Shigesada K et al (1999) Biallelic and heterozygous point mutations in the runt

domain of the AML1/PEBP2alphaB gene associated with myeloblastic leukemias. *Blood* 93: 1817-1824

Otto F, Thornell AP, Crompton T, Denzel A, Gilmour KC, Rosewell IR, Stamp GW, Beddington RS, Mundlos S, Olsen BR et al (1997) Cbfa1, a candidate gene for cleidocranial dysplasia syndrome, is essential for osteoblast differentiation and bone development. *Cell* 89: 765-771

Pabst T, Mueller BU, Harakawa N, Schoch C, Haferlach T, Behre G, Hiddemann W, Zhang DE, Tenen DG (2001a) AML1-ETO downregulates the granulocytic differentiation factor C/EBPalpha in t(8;21) myeloid leukemia. *Nat Med* 7: 444-451

Pabst T, Mueller BU, Zhang P, Radomska HS, Narravula S, Schnittger S, Behre G, Hiddemann W, Tenen DG (2001b) Dominant-negative mutations of CEBPA, encoding CCAAT/enhancer binding protein-alpha (C/EBPalpha), in acute myeloid leukemia. *Nat Genet* 27: 263-270

Paik WK, Kim S (1967) Enzymatic methylation of protein fractions from calf thymus nuclei. *Biochem Biophys Res Commun* 29: 14-20

Paik WK, Kim S (1968) Protein methylase I. Purification and properties of the enzyme. *J Biol Chem* 243: 2108-2114

Palis J, Robertson S, Kennedy M, Wall C, Keller G (1999) Development of erythroid and myeloid progenitors in the yolk sac and embryo proper of the mouse. *Development* 126: 5073-5084

Panzenbock B, Bartunek P, Mapara MY, Zenke M (1998) Growth and differentiation of human stem cell factor/erythropoietin-dependent erythroid progenitor cells in vitro. *Blood* 92: 3658-3668

Papadokostopoulou A, Mathioudaki K, Scorilas A, Xynopoulos D, Ardavanis A, Kouroumalis E, Talieri M (2009) Colon cancer and protein arginine methyltransferase 1 gene expression. *Anticancer Res* 29: 1361-1366

Park JH, Szemes M, Vieira GC, Melegh Z, Malik S, Heesom KJ, Von Wallwitz-Freitas L, Greenhough A, Brown KW, Zheng YG et al (2015) Protein arginine methyltransferase 5 is a key regulator of the MYCN oncoprotein in neuroblastoma cells. *Mol Oncol* 9: 617-627

Pasvol G, Jungery M, Weatherall DJ, Parsons SF, Anstee DJ, Tanner MJ (1982a) Glycophorin as a possible receptor for *Plasmodium falciparum*. *Lancet* 2: 947-950

Pasvol G, Wainscoat JS, Weatherall DJ (1982b) Erythrocytes deficiency in glycophorin resist invasion by the malarial parasite *Plasmodium falciparum*. *Nature* 297: 64-66

- Patel SR, Hartwig JH, Italiano JE, Jr. (2005) The biogenesis of platelets from megakaryocyte proplatelets. *J Clin Invest* 115: 3348-3354
- Paull KD, Shoemaker RH, Boyd MR, Parsons JL, Risbood PA, Barbera WA, Sharma MN, Baker DC, Hand E, Scudiero DA (1988) The synthesis of XTT: A new tetrazolium reagent that is bio-reducible to a water-soluble formazan. *Journal of Heterocyclic Chemistry* 25: 911-914
- Petrovick MS, Hiebert SW, Friedman AD, Hetherington CJ, Tenen DG, Zhang DE (1998) Multiple functional domains of AML1: PU.1 and C/EBPalpha synergize with different regions of AML1. *Mol Cell Biol* 18: 3915-3925
- Pfaffl MW (2001) A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic acids research* 29: e45
- Phalke S, Mzoughi S, Bezzi M, Jennifer N, Mok WC, Low DH, Thike AA, Kuznetsov VA, Tan PH, Voorhoeve PM et al (2012) p53-Independent regulation of p21Waf1/Cip1 expression and senescence by PRMT6. *Nucleic acids research* 40: 9534-9542
- Phillips DR, Charo IF, Parise LV, Fitzgerald LA (1988) The platelet membrane glycoprotein IIb-IIIa complex. *Blood* 71: 831-843
- Pina C, Enver T (2007) Differential contributions of haematopoietic stem cells to foetal and adult haematopoiesis: insights from functional analysis of transcriptional regulators. *Oncogene* 26: 6750-6765
- Pollock R, Weichselbaum R, Bast R, Kufe D, Gansler T (2003) *Holland-Frei Cancer Medicine*. BC Decker Inc, Hamilton
- Poole J (2000) Red cell antigens on band 3 and glycophorin A. *Blood Rev* 14: 31-43
- Porcher C, Chagraoui H, Kristiansen MS (2017) SCL/TAL1: a multifaceted regulator from blood development to disease. *Blood* 129: 2051-2060
- Prelich G (2012) Gene overexpression: uses, mechanisms, and interpretation. *Genetics* 190: 841-854
- Putz G, Rosner A, Nuesslein I, Schmitz N, Buchholz F (2006) AML1 deletion in adult mice causes splenomegaly and lymphomas. *Oncogene* 25: 929-939
- Rana AP, Ruff P, Maalouf GJ, Speicher DW, Chishti AH (1993) Cloning of human erythroid dematin reveals another member of the villin family. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90: 6651-6655
- Raptis V, Kapoulas S, Grekas D (2013) Role of asymmetrical dimethylarginine in the progression of renal disease. *Nephrology (Carlton)* 18: 11-21

- Reed-Inderbitzin E, Moreno-Miralles I, Vanden-Eynden SK, Xie J, Lutterbach B, Durst-Goodwin KL, Luce KS, Irvin BJ, Cleary ML, Brandt SJ et al (2006) RUNX1 associates with histone deacetylases and SUV39H1 to repress transcription. *Oncogene* 25: 5777-5786
- Rennert J, Coffman JA, Mushegian AR, Robertson AJ (2003) The evolution of Runx genes I. A comparative study of sequences from phylogenetically diverse model organisms. *BMC Evol Biol* 3: 4
- Richardson JL, Shivdasani RA, Boers C, Hartwig JH, Italiano JE, Jr. (2005) Mechanisms of organelle transport and capture along proplatelets during platelet production. *Blood* 106: 4066-4075
- Rieger MA, Schroeder T (2012) Hematopoiesis. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 4
- Roehm NW, Rodgers GH, Hatfield SM, Glasebrook AL (1991) An improved colorimetric assay for cell proliferation and viability utilizing the tetrazolium salt XTT. *J Immunol Methods* 142: 257-265
- Rossaint R (2004) Die Anästhesiologie: Allgemeine und spezielle Anästhesiologie, Schmerztherapie und Intensivmedizin: Springer
- Roth SY, Denu JM, Allis CD (2001) Histone acetyltransferases. *Annu Rev Biochem* 70: 81-120
- Rots NY, Iavarone A, Bromleigh V, Freedman LP (1999) Induced differentiation of U937 cells by 1,25-dihydroxyvitamin D3 involves cell cycle arrest in G1 that is preceded by a transient proliferative burst and an increase in cyclin expression. *Blood* 93: 2721-2729
- Ruthenburg AJ, Wang W, Graybosch DM, Li H, Allis CD, Patel DJ, Verdine GL (2006) Histone H3 recognition and presentation by the WDR5 module of the MLL1 complex. *Nat Struct Mol Biol* 13: 704-712
- Saiki RK, Gelfand DH, Stoffel S, Scharf SJ, Higuchi R, Horn GT, Mullis KB, Erlich HA (1988) Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* 239: 487-491
- San-Miguel JF, Hungria VT, Yoon SS, Beksac M, Dimopoulos MA, Elghandour A, Jedrzejczak WW, Gunther A, Nakorn TN, Siritanaratkul N et al (2014) Panobinostat plus bortezomib and dexamethasone versus placebo plus bortezomib and dexamethasone in patients with relapsed or relapsed and refractory multiple myeloma: a multicentre, randomised, double-blind phase 3 trial. *Lancet Oncol* 15: 1195-1206
- Santini V, Melnick A, Maciejewski JP, Duprez E, Nervi C, Cocco L, Ford KG, Mufti G (2013) Epigenetics in focus: pathogenesis of myelodysplastic syndromes and the role of hypomethylating agents. *Crit Rev Oncol Hematol* 88: 231-245

Sarda S, Hannenhalli S (2014) Next-generation sequencing and epigenomics research: a hammer in search of nails. *Genomics Inform* 12: 2-11

Sasaki K, Yagi H, Bronson RT, Tominaga K, Matsunashi T, Deguchi K, Tani Y, Kishimoto T, Komori T (1996) Absence of fetal liver hematopoiesis in mice deficient in transcriptional coactivator core binding factor beta. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93: 12359-12363

Satoh Y, Matsumura I, Tanaka H, Ezoe S, Fukushima K, Tokunaga M, Yasumi M, Shibayama H, Mizuki M, Era T et al (2008) AML1/RUNX1 works as a negative regulator of c-Mpl in hematopoietic stem cells. *J Biol Chem* 283: 30045-30056

Scaramuzzino C, Casci I, Parodi S, Lievens PM, Polanco MJ, Milioto C, Chivet M, Monaghan J, Mishra A, Badders N et al (2015) Protein arginine methyltransferase 6 enhances polyglutamine-expanded androgen receptor function and toxicity in spinal and bulbar muscular atrophy. *Neuron* 85: 88-100

Schmidt RF, Lang F, Heckmann M (2011) *Physiologie des menschen: mit pathophysiologie*: Springer-Verlag

Schreiber E, Matthias P, Muller MM, Schaffner W (1989) Rapid detection of octamer binding proteins with 'mini-extracts', prepared from a small number of cells. *Nucleic acids research* 17: 6419

Schreiber M, Muller WJ, Singh G, Graham FL (1999) Comparison of the effectiveness of adenovirus vectors expressing cyclin kinase inhibitors p16INK4A, p18INK4C, p19INK4D, p21(WAF1/CIP1) and p27KIP1 in inducing cell cycle arrest, apoptosis and inhibition of tumorigenicity. *Oncogene* 18: 1663-1676

Scoumanne A, Chen X (2008) Protein methylation: a new mechanism of p53 tumor suppressor regulation. *Histol Histopathol* 23: 1143-1149

Scudiero DA, Shoemaker RH, Paull KD, Monks A, Tierney S, Nofziger TH, Currans MJ, Seniff D, Boyd MR (1988) Evaluation of a soluble tetrazolium/formazan assay for cell growth and drug sensitivity in culture using human and other tumor cell lines. *Cancer Res* 48: 4827-4833

Sgarra R, Lee J, Tessari MA, Altamura S, Spolaore B, Giancotti V, Bedford MT, Manfioletti G (2006) The AT-hook of the chromatin architectural transcription factor high mobility group A1a is arginine-methylated by protein arginine methyltransferase 6. *J Biol Chem* 281: 3764-3772

Shattil SJ, Kashiwagi H, Pampori N (1998) Integrin signaling: the platelet paradigm. *Blood* 91: 2645-2657

Sherr CJ, Roberts JM (1999) CDK inhibitors: positive and negative regulators of G1-phase progression. *Genes Dev* 13: 1501-1512

Shia WJ, Okumura AJ, Yan M, Sarkeshik A, Lo MC, Matsuura S, Komeno Y, Zhao X, Nimer SD, Yates JR, 3rd et al (2012) PRMT1 interacts with AML1-ETO to promote its transcriptional activation and progenitor cell proliferative potential. *Blood* 119: 4953-4962

Singhroy DN, Mesplede T, Sabbah A, Quashie PK, Falgout JP, Wainberg MA (2013) Automethylation of protein arginine methyltransferase 6 (PRMT6) regulates its stability and its anti-HIV-1 activity. *Retrovirology* 10: 73

Society AC (2017) Key Statistics for Acute Myeloid Leukemia.
<https://www.cancer.org/cancer/acute-myeloid-leukemia/about/key-statistics.html> 27.12.2017

Sood R, Kamikubo Y, Liu P (2017) Role of RUNX1 in hematological malignancies. *Blood* 129: 2070-2082

Speck NA, Baltimore D (1987) Six distinct nuclear factors interact with the 75-base-pair repeat of the Moloney murine leukemia virus enhancer. *Mol Cell Biol* 7: 1101-1110

Spivak JL (2005) The anaemia of cancer: death by a thousand cuts. *Nat Rev Cancer* 5: 543-555

Stavridis P, Arampatzis P, Papamatheakis J (2013) Differential regulation of MHCII genes by PRMT6, via an AT-hook motif of RFX5. *Mol Immunol* 56: 390-398

Stein C, Notzold RR, Riedl S, Bouchard C, Bauer UM (2016) The Arginine Methyltransferase PRMT6 Cooperates with Polycomb Proteins in Regulating HOXA Gene Expression. *PLoS One* 11: e0148892

Stein C, Riedl S, Ruthnick D, Notzold RR, Bauer UM (2012) The arginine methyltransferase PRMT6 regulates cell proliferation and senescence through transcriptional repression of tumor suppressor genes. *Nucleic acids research* 40: 9522-9533

Sullivan JC, Sher D, Eisenstein M, Shigesada K, Reitzel AM, Marlow H, Levanon D, Groner Y, Finnerty JR, Gat U (2008) The evolutionary origin of the Runx/CBFBeta transcription factors--studies of the most basal metazoans. *BMC Evol Biol* 8: 228

Sun Q, Liu L, Roth M, Tian J, He Q, Zhong B, Bao R, Lan X, Jiang C, Sun J et al (2015) PRMT1 Upregulated by Epithelial Proinflammatory Cytokines Participates in COX2 Expression in Fibroblasts and Chronic Antigen-Induced Pulmonary Inflammation. *J Immunol* 195: 298-306

Sun Q, Liu L, Wang H, Mandal J, Khan P, Hostettler KE, Stolz D, Tamm M, Molino A, Lardinois D (2017) Constitutive high expression of protein arginine methyltransferase 1 in asthmatic airway smooth muscle cells is caused by reduced microRNA-19a expression and leads to enhanced remodeling. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*

Sun Y, Chung HH, Woo ARE, Lin VCL (2014) Protein arginine methyltransferase 6 enhances ligand-dependent and -independent activity of estrogen receptor α via distinct mechanisms. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research* 1843: 2067-2078

Swiercz R, Cheng D, Kim D, Bedford MT (2007) Ribosomal protein rpS2 is hypomethylated in PRMT3-deficient mice. *J Biol Chem* 282: 16917-16923

Tahirov TH, Inoue-Bungo T, Morii H, Fujikawa A, Sasaki M, Kimura K, Shiina M, Sato K, Kumasaka T, Yamamoto M et al (2001) Structural analyses of DNA recognition by the AML1/Runx-1 Runt domain and its allosteric control by CBFbeta. *Cell* 104: 755-767

Takahashi A, Satake M, Yamaguchi-Iwai Y, Bae SC, Lu J, Maruyama M, Zhang YW, Oka H, Arai N, Arai K et al (1995) Positive and negative regulation of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor promoter activity by AML1-related transcription factor, PEBP2. *Blood* 86: 607-616

Tanaka T, Kurokawa M, Ueki K, Tanaka K, Imai Y, Mitani K, Okazaki K, Sagata N, Yazaki Y, Shibata Y et al (1996) The extracellular signal-regulated kinase pathway phosphorylates AML1, an acute myeloid leukemia gene product, and potentially regulates its transactivation ability. *Mol Cell Biol* 16: 3967-3979

Tanaka T, Tanaka K, Ogawa S, Kurokawa M, Mitani K, Nishida J, Shibata Y, Yazaki Y, Hirai H (1995) An acute myeloid leukemia gene, AML1, regulates hemopoietic myeloid cell differentiation and transcriptional activation antagonistically by two alternative spliced forms. *EMBO J* 14: 341-350

Teerlink T, Luo Z, Palm F, Wilcox CS (2009) Cellular ADMA: regulation and action. *Pharmacol Res* 60: 448-460

Tenen DG, Hromas R, Licht JD, Zhang DE (1997) Transcription factors, normal myeloid development, and leukemia. *Blood* 90: 489-519

Teyssier C, Le Romancer M, Sentis S, Jalaguier S, Corbo L, Cavailles V (2010) Protein arginine methylation in estrogen signaling and estrogen-related cancers. *Trends Endocrinol Metab* 21: 181-189

Thul PJ, Lindskog C (2018) The human protein atlas: A spatial map of the human proteome. *Protein Sci* 27: 233-244

Tijssen MR, Ghevaert C (2013) Transcription factors in late megakaryopoiesis and related platelet disorders. *J Thromb Haemost* 11: 593-604

Tomer A, Harker LA, Burstein SA (1987) Purification of human megakaryocytes by fluorescence-activated cell sorting. *Blood* 70: 1735-1742

- Tomer A, Harker LA, Burstein SA (1988) Flow cytometric analysis of normal human megakaryocytes. *Blood* 71: 1244-1252
- Tootle TL, Rebay I (2005) Post-translational modifications influence transcription factor activity: a view from the ETS superfamily. *Bioessays* 27: 285-298
- Tsiftoglou AS, Vizirianakis IS, Strouboulis J (2009) Erythropoiesis: model systems, molecular regulators, and developmental programs. *IUBMB Life* 61: 800-830
- Uhlen M, Bjorling E, Agaton C, Szigartyo CA, Amini B, Andersen E, Andersson AC, Angelidou P, Asplund A, Asplund C et al (2005) A human protein atlas for normal and cancer tissues based on antibody proteomics. *Mol Cell Proteomics* 4: 1920-1932
- Vainchenker W, Deschamps JF, Bastin JM, Guichard J, Titeux M, Breton-Gorius J, McMichael AJ (1982) Two monoclonal antiplatelet antibodies as markers of human megakaryocyte maturation: immunofluorescent staining and platelet peroxidase detection in megakaryocyte colonies and in in vivo cells from normal and leukemic patients. *Blood* 59: 514-521
- van Wijnen AJ, Stein GS, Gergen JP, Groner Y, Hiebert SW, Ito Y, Liu P, Neil JC, Ohki M, Speck N (2004) Nomenclature for Runt-related (RUNX) proteins. *Oncogene* 23: 4209-4210
- Veland N, Hardikar S, Zhong Y, Gayatri S, Dan J, Strahl BD, Rothbart SB, Bedford MT, Chen T (2017) The Arginine Methyltransferase PRMT6 Regulates DNA Methylation and Contributes to Global DNA Hypomethylation in Cancer. *Cell Rep* 21: 3390-3397
- Vermeulen M, Eberl HC, Matarese F, Marks H, Denissov S, Butter F, Lee KK, Olsen JV, Hyman AA, Stunnenberg HG et al (2010) Quantitative interaction proteomics and genome-wide profiling of epigenetic histone marks and their readers. *Cell* 142: 967-980
- Vidal A, Koff A (2000) Cell-cycle inhibitors: three families united by a common cause. *Gene* 247: 1-15
- Vu LP, Perna F, Wang L, Voza F, Figueroa ME, Tempst P, Erdjument-Bromage H, Gao R, Chen S, Paietta E et al (2013) PRMT4 blocks myeloid differentiation by assembling a methyl-RUNX1-dependent repressor complex. *Cell Rep* 5: 1625-1638
- Wagner JM, Hackanson B, Lubbert M, Jung M (2010) Histone deacetylase (HDAC) inhibitors in recent clinical trials for cancer therapy. *Clin Epigenetics* 1: 117-136
- Waldmann T, Izzo A, Kamieniarz K, Richter F, Vogler C, Sarg B, Lindner H, Young NL, Mittler G, Garcia BA et al (2011) Methylation of H2AR29 is a novel repressive PRMT6 target. *Epigenetics Chromatin* 4: 11

- Wang C, Jiang H, Jin J, Xie Y, Chen Z, Zhang H, Lian F, Liu YC, Zhang C, Ding H et al (2017) Development of Potent Type I Protein Arginine Methyltransferase (PRMT) Inhibitors of Leukemia Cell Proliferation. *J Med Chem* 60: 8888-8905
- Wang H, Huang ZQ, Xia L, Feng Q, Erdjument-Bromage H, Strahl BD, Briggs SD, Allis CD, Wong J, Tempst P et al (2001) Methylation of histone H4 at arginine 3 facilitating transcriptional activation by nuclear hormone receptor. *Science* 293: 853-857
- Wang J, Zhuang J, Iyer S, Lin X, Whitfield TW, Greven MC, Pierce BG, Dong X, Kundaje A, Cheng Y et al (2012a) Sequence features and chromatin structure around the genomic regions bound by 119 human transcription factors. *Genome Res* 22: 1798-1812
- Wang L, Huang G, Zhao X, Hatlen MA, Vu L, Liu F, Nimer SD (2009) Post-translational modifications of Runx1 regulate its activity in the cell. *Blood Cells Mol Dis* 43: 30-34
- Wang L, Pal S, Sif S (2008) Protein arginine methyltransferase 5 suppresses the transcription of the RB family of tumor suppressors in leukemia and lymphoma cells. *Mol Cell Biol* 28: 6262-6277
- Wang Q, Stacy T, Binder M, Marin-Padilla M, Sharpe AH, Speck NA (1996a) Disruption of the Cbfa2 gene causes necrosis and hemorrhaging in the central nervous system and blocks definitive hematopoiesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93: 3444-3449
- Wang Q, Stacy T, Miller JD, Lewis AF, Gu TL, Huang X, Bushweller JH, Bories JC, Alt FW, Ryan G et al (1996b) The CBFbeta subunit is essential for CBFalpha2 (AML1) function in vivo. *Cell* 87: 697-708
- Wang S, Tan X, Yang B, Yin B, Yuan J, Qiang B, Peng X (2012b) The role of protein arginine-methyltransferase 1 in gliomagenesis. *BMB Rep* 45: 470-475
- Wang S, Wang Q, Crute BE, Melnikova IN, Keller SR, Speck NA (1993) Cloning and characterization of subunits of the T-cell receptor and murine leukemia virus enhancer core-binding factor. *Mol Cell Biol* 13: 3324-3339
- Wang Y, Wysocka J, Sayegh J, Lee YH, Perlin JR, Leonelli L, Sonbuchner LS, McDonald CH, Cook RG, Dou Y et al (2004) Human PAD4 regulates histone arginine methylation levels via demethyl elimination. *Science* 306: 279-283
- Warrell RP, Jr., He LZ, Richon V, Calleja E, Pandolfi PP (1998) Therapeutic targeting of transcription in acute promyelocytic leukemia by use of an inhibitor of histone deacetylase. *J Natl Cancer Inst* 90: 1621-1625
- Warren AJ, Bravo J, Williams RL, Rabbitts TH (2000) Structural basis for the heterodimeric interaction between the acute leukaemia-associated transcription factors AML1 and CBFbeta. *EMBO J* 19: 3004-3015

Weber K, Bartsch U, Stocking C, Fehse B (2008) A multicolor panel of novel lentiviral "gene ontology" (LeGO) vectors for functional gene analysis. *Mol Ther* 16: 698-706

Wei H, Mundade R, Lange KC, Lu T (2014) Protein arginine methylation of non-histone proteins and its role in diseases. *Cell Cycle* 13: 32-41

Weislow OS, Kiser R, Fine DL, Bader J, Shoemaker RH, Boyd MR (1989) New soluble-formazan assay for HIV-1 cytopathic effects: application to high-flux screening of synthetic and natural products for AIDS-antiviral activity. *J Natl Cancer Inst* 81: 577-586

Weissman IL (2000) Stem cells: units of development, units of regeneration, and units in evolution. *Cell* 100: 157-168

Wickrema A, Crispino JD (2007) Erythroid and megakaryocytic transformation. *Oncogene* 26: 6803-6815

Wilson NK, Foster SD, Wang X, Knezevic K, Schutte J, Kaimakis P, Chilarska PM, Kinston S, Ouwehand WH, Dzierzak E et al (2010) Combinatorial transcriptional control in blood stem/progenitor cells: genome-wide analysis of ten major transcriptional regulators. *Cell Stem Cell* 7: 532-544

Wintrobe MM (2009) Wintrobe's clinical hematology: Lippincott Williams & Wilkins

Wolf SS (2009) The protein arginine methyltransferase family: an update about function, new perspectives and the physiological role in humans. *Cell Mol Life Sci* 66: 2109-2121

Wotton D, Ghysdael J, Wang S, Speck NA, Owen MJ (1994) Cooperative binding of Ets-1 and core binding factor to DNA. *Mol Cell Biol* 14: 840-850

Wu H, Klingmuller U, Besmer P, Lodish HF (1995) Interaction of the erythropoietin and stem-cell-factor receptors. *Nature* 377: 242-246

Xie B, Invernizzi CF, Richard S, Wainberg MA (2007) Arginine methylation of the human immunodeficiency virus type 1 Tat protein by PRMT6 negatively affects Tat Interactions with both cyclin T1 and the Tat transactivation region. *J Virol* 81: 4226-4234

Yadav N, Lee J, Kim J, Shen J, Hu MC, Aldaz CM, Bedford MT (2003) Specific protein methylation defects and gene expression perturbations in coactivator-associated arginine methyltransferase 1-deficient mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100: 6464-6468

Yamagata T, Maki K, Mitani K (2005) Runx1/AML1 in normal and abnormal hematopoiesis. *Int J Hematol* 82: 1-8

- Yamaguchi Y, Kurokawa M, Imai Y, Izutsu K, Asai T, Ichikawa M, Yamamoto G, Nitta E, Yamagata T, Sasaki K et al (2004) AML1 is functionally regulated through p300-mediated acetylation on specific lysine residues. *J Biol Chem* 279: 15630-15638
- Yang Y, Bedford MT (2013) Protein arginine methyltransferases and cancer. *Nat Rev Cancer* 13: 37-50
- Yao H, Li P, Venters BJ, Zheng S, Thompson PR, Pugh BF, Wang Y (2008) Histone Arg modifications and p53 regulate the expression of OKL38, a mediator of apoptosis. *J Biol Chem* 283: 20060-20068
- Yokomizo T, Hasegawa K, Ishitobi H, Osato M, Ema M, Ito Y, Yamamoto M, Takahashi S (2008) Runx1 is involved in primitive erythropoiesis in the mouse. *Blood* 111: 4075-4080
- Yokomizo T, Ogawa M, Osato M, Kanno T, Yoshida H, Fujimoto T, Fraser S, Nishikawa S, Okada H, Satake M et al (2001) Requirement of Runx1/AML1/PEBP2alphaB for the generation of haematopoietic cells from endothelial cells. *Genes Cells* 6: 13-23
- Yoshimatsu M, Toyokawa G, Hayami S, Unoki M, Tsunoda T, Field HI, Kelly JD, Neal DE, Maehara Y, Ponder BA et al (2011) Dysregulation of PRMT1 and PRMT6, Type I arginine methyltransferases, is involved in various types of human cancers. *International journal of cancer* 128: 562-573
- Yu Z, Chen T, Hebert J, Li E, Richard S (2009) A mouse PRMT1 null allele defines an essential role for arginine methylation in genome maintenance and cell proliferation. *Mol Cell Biol* 29: 2982-2996
- Zakrzewicz D, Zakrzewicz A, Preissner KT, Markart P, Wygrecka M (2012) Protein Arginine Methyltransferases (PRMTs): promising targets for the treatment of pulmonary disorders. *Int J Mol Sci* 13: 12383-12400
- Zhang DE, Fujioka K, Hetherington CJ, Shapiro LH, Chen HM, Look AT, Tenen DG (1994) Identification of a region which directs the monocytic activity of the colony-stimulating factor 1 (macrophage colony-stimulating factor) receptor promoter and binds PEBP2/CBF (AML1). *Mol Cell Biol* 14: 8085-8095
- Zhang W, Bone JR, Edmondson DG, Turner BM, Roth SY (1998) Essential and redundant functions of histone acetylation revealed by mutation of target lysines and loss of the Gcn5p acetyltransferase. *EMBO J* 17: 3155-3167
- Zhang X, Cheng X (2003) Structure of the predominant protein arginine methyltransferase PRMT1 and analysis of its binding to substrate peptides. *Structure* 11: 509-520
- Zhang X, Zhou L, Cheng X (2000) Crystal structure of the conserved core of protein arginine methyltransferase PRMT3. *EMBO J* 19: 3509-3519

- Zhang Y, Adachi M, Kawamura R, Zou HC, Imai K, Hareyama M, Shinomura Y (2006) Bmf contributes to histone deacetylase inhibitor-mediated enhancing effects on apoptosis after ionizing radiation. *Apoptosis* 11: 1349-1357
- Zhao Q, Rank G, Tan YT, Li H, Moritz RL, Simpson RJ, Cerruti L, Curtis DJ, Patel DJ, Allis CD et al (2009) PRMT5-mediated methylation of histone H4R3 recruits DNMT3A, coupling histone and DNA methylation in gene silencing. *Nat Struct Mol Biol* 16: 304-311
- Zhao X, Jankovic V, Gural A, Huang G, Pardanani A, Menendez S, Zhang J, Dunne R, Xiao A, Erdjument-Bromage H et al (2008) Methylation of RUNX1 by PRMT1 abrogates SIN3A binding and potentiates its transcriptional activity. *Genes Dev* 22: 640-653
- Zheng YG, Wu J, Chen Z, Goodman M (2008) Chemical regulation of epigenetic modifications: opportunities for new cancer therapy. *Med Res Rev* 28: 645-687
- Zhou D, Liu K, Sun CW, Pawlik KM, Townes TM (2010) KLF1 regulates BCL11A expression and gamma- to beta-globin gene switching. *Nat Genet* 42: 742-744
- Zhou P, Yao Y, Soh JW, Weinstein IB (1999) Overexpression of p21Cip1 or p27Kip1 in the promyelocytic leukemia cell line HL60 accelerates its lineage-specific differentiation. *Anticancer Res* 19: 4935-4945
- Zou Y, Webb K, Perna AD, Zhang Q, Clarke S, Wang Y (2007) A mass spectrometric study on the in vitro methylation of HMGA1a and HMGA1b proteins by PRMTs: methylation specificity, the effect of binding to AT-rich duplex DNA, and the effect of C-terminal phosphorylation. *Biochemistry* 46: 7896-7906
- Zurita-Lopez CI, Sandberg T, Kelly R, Clarke SG (2012) Human protein arginine methyltransferase 7 (PRMT7) is a type III enzyme forming omega-NG-monomethylated arginine residues. *J Biol Chem* 287: 7859-7870

6 Abkürzungsverzeichnis

α	alpha- oder anti- (bei Antikörpern)
%	(v/v) Volumenprozent
% (w/v)	Gewichtsvolumenprozent
% (w/w)	Gewichtsprozent
°C	Grad Celsius
μg	Mikrogramm
μl	Mikroliter
μM	Mikromolar
Abb.	Abbildung
ac	Acetylierung
ad	<i>addiere</i> (hier „auffüllen auf“)
ADMA	asymmetrische Dimethylierung
ADOX	Adenosin-2'-3'-dialdehyd
AG	Arbeitsgruppe
ALL	akute lymphoblastische Leukämie
AML	akute myeloische Leukämie
APC	Allophycocyanin
ATP	Adenosintriphosphat
AMP	Adenosinmonosphat
bp	Basenpaar
bHLH	<i>basic helix-loop-helix</i>
bzw.	beziehungsweise
ca.	<i>circa</i>
CD	<i>cluster of differentiation</i>
cDNA	<i>complementary DNA</i>
CFU	<i>colony forming unit</i>
ChIP	Chromatin-Immunopräzipitation
CML	chronische myeloische Leukämie
CLP	Lymphoide Vorläuferzelle (<i>common lymphoid progenitor</i>)
CMP	myeloische Vorläuferzelle (<i>common myeloid progenitor</i>)
CMV	Cytomegalievirus
CT	<i>crossing time</i>
Ctrl	<i>control</i> , Kontrolle
Da	Dalton
dd	<i>double distilled</i>
d.h.	das heißt
DMEM	<i>Dulbecco's modified eagle's medium</i>
DNA	<i>desoxyribonucleic acid</i>
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
DRK	Deutsches Rotes Kreuz
DTT	Dithiothreitol
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
ECL	<i>enhanced chemiluminescence</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGTA	Ethylenglycoltetraessigsäure
eGFP	<i>enhanced green fluorescent protein</i>
EPO	Erythropoetin
ES	<i>embryonic stem cell</i>
<i>et al.</i>	und andere (lat. <i>et alii</i>)
FACS	<i>fluorescence activated cell sorting</i>
FCS	<i>fetal calf serum</i> , fötales Kälberserum
FPD	<i>familial platelet disorder</i>

FSC	<i>forward scatter</i>
fw	<i>forward</i>
g	Gramm
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
GAR	Glycin-Arginin-reich
GFP	<i>green fluorescent protein</i>
GST	Glutathion-S-Transferase
h	<i>human</i>
H	Histon
HDAC	Histone-Deacetylase
HSC	<i>hematopoietic stem cell</i>
IgG	Immunoglobulin G
IL	Interleukin
IP	Immunopräzipitation
IRES	<i>internal ribosome entry site</i>
LB	<i>lysogeny broth</i>
m	murin
M-CSF	<i>macrophage colony-stimulating factor</i>
M-CSFR	<i>macrophage colony-stimulating factor receptor</i>
me	Methylierung
MEP	<i>megakaryocytic-erythroid progenitor</i>
MFI	<i>mean fluorescence intensity</i>
min	Minute
MK	Megakaryozyten
mRNA	<i>messenger RNA</i>
NEB	New England Biolabs
nm	Nanometer
OD	optische Dichte
P	Phosphorylierung
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung (<i>phosphate buffered saline</i>)
PCR	<i>polymerase chain reaction</i>
qPCR	<i>quantitative real-time PCR</i>
qRT-PCR	<i>quantitative reverse transcription PCR</i>
rev	<i>reverse</i>
RIPA	<i>radioimmunoprecipitation assay</i>
RNA	<i>ribonucleic acid</i>
RNAPII	RNA-Polymerase II
RNase	Ribonuklease
rpm	<i>revolutions per minute</i>
RPMI	<i>Roswell Park Memorial Institute</i>
RT	reverse Transkriptase
RT-PCR	<i>reverse transcription PCR</i>
SAM	S-Adenosyl-L-Methionin
SCF	<i>stem cell factor</i>
SDS	Natriumdodecylsulfat (sodium dodecyl sulfate)
Sek	Sekunde
SFFV	spleen focus forming virus
sh	short hairpin
SSC	side scatter
SV40	simian vacuolating virus 40
ONPG	o-Nitrophenyl- β -D-galactopyranosid
PBS	Phosphatgepufferte Kochsalzlösung
PEI	Polyethylenimin
PRMT	Protein-Argininmethyltransferase
Tab.	Tabelle

TAE-Puffer	TRIS-Acetat-EDTA-Puffer
TE-Puffer	TRIS-EDTA-Puffer
T _m	Schmelztemperatur
TPO	Thrombopoetin
U	unit
ub	Ubiquitin
UV	ultraviolett
V	Volt
VSV-G	Glycoprotein G des Vesicular-Stomatitis-Virus (VSV)
WPRE	<i>woodchuck hepatitis virus posttranscriptional regulatory element</i>
wt	Wildtyp
z.B.	zum Beispiel
Zeo	Zeocin

Abkürzungen für Aminosäuren und Nukleotide sind nach IUPAC-Standard angegeben.
Abkürzungen für die verwendeten Substanzen sind in der Chemikalienliste (siehe Kapitel 2.1.1.) angegeben.

7 Abbildungs- und Tabellenverzeichnis

7.1 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1. 1: Die Ontogenie der hämatopoetischen Zellen während der Entwicklung des Embryos	5
Abbildung 1. 2: Das hämatopoetische System	7
Abbildung 1. 3: Entwicklung der Erythrozyten	9
Abbildung 1. 4: Entwicklung der Thrombozyten	13
Abbildung 1. 5: Transkriptionsfaktoren in der Hämatopoese	16
Abbildung 1. 6: RUNX1-Isoformen	20
Abbildung 1. 7 Die Chromatinorganisation	25
Abbildung 1. 8 Histon-modifizierende Enzyme	27
Abbildung 1. 9: Die Proteinfamilie der PRMTs.	29
Abbildung 1. 10: Kristallstruktur von PRMT1.	30
Abbildung 1. 11 Mechanismus der Arginin-Methylierung der PRMTs.	31
Abbildung 1. 12: Die PRMT6 Aktivität auf RUNX1-Zielgenen.....	35
Abbildung 2. 1: Vektorkarte des lentiviralen Vektors SEW-shRNA.	54
Abbildung 2. 2: Vektorkarte des lentiviralen Vektors LeGOiG2	55
Abbildung 2. 3: Vektorkarte des Luciferase-Reportergen-Vektors pGL4.10 (luc2).....	56
Abbildung 2. 4: Vektorkarte des Expressionsplasmids 2HA-pcDNA3	56
Abbildung 3. 1: Wachstumskurve nach PRMT6 <i>Knockdown</i>	76
Abbildung 3. 2: Analyse des Tumorwachstum mit Hilfe eines <i>Xenograft</i> -Experiments mit shPRMT6 <i>Knockdown</i> -Konstrukten	78
Abbildung 3. 3: <i>Colony forming unit</i> -Assay mit primären CD34+-Zellen.....	79
Abbildung 3. 4: Darstellung der Expression von PRMT6 in <i>tissue-microarray</i> -Proben von AML-Patienten	80
Abbildung 3. 5: Korrelation der PRMT6-Expression mit dem Geschlecht und dem FAB-Subtyp der AML-Patienten	82
Abbildung 3. 6: Western Blot und <i>Microarray</i> -Expressionsanalyse.....	83
Abbildung 3. 7: Verifizierung der Expressionsveränderungen durch PRMT6- <i>Knockdown</i>	85
Abbildung 3. 8: Identifizierung direkter Zielgene von PRMT6	86
Abbildung 3. 9: Schematische Darstellung des <i>CDKN1B</i> -Promotors und der Effekt von RUNX1 auf den <i>CDKN1B</i> -Promotor.....	88
Abbildung 3. 10: Schematische Darstellung und Analyse der Besetzung des <i>CDKN1B</i> -Promotors	90

Abbildung 3. 11: Darstellung der Bestimmung der IC ₅₀ -Konzentration der PRMT6-Inhibitoren mittels XTT-Assay.....	93
Abbildung 3. 12: Expressionsveränderungen durch PRMT6-Inhibition.....	93
Abbildung 3. 13: Zellzyklus-Analyse der mit Lie1417-behandelten K562-Zellen.....	94
Abbildung 3. 14: Einfluss der PRMT6-Manipulation auf die erythroide Differenzierung	97
Abbildung 3. 16: Genexpressionsanalyse nach Herunterregulation von PRMT6.	99
Abbildung 3. 17: Verifizierung der Genexpressionsveränderung erythroider Gene nach PRMT6- <i>Knockdown</i>	101
Abbildung 3. 18: Genexpressionsveränderung erythroider Gene nach PRMT6- <i>Knockdown</i>	102
Abbildung 3. 19: Durchflusszytometrische Analyse der Oberflächenexpression in PRMT6- herunterregulierten K562-Zellen.	104
Abbildung 3. 20 : Schematische Darstellung und Besetzung des <i>GYP</i> A-Promotors.....	106
Abbildung 3. 21: Einfluss von RUNX1 auf den <i>GYP</i> A-Promotor und die Expression.	107
Abbildung 3. 22: Differenzierung von humanen primären CD34+-Zellen	109
Abbildung 3. 23: Expression von <i>GYP</i> A nach erythroider oder megakaryozytärer Differenzierung.....	110
Abbildung 3. 24: Besetzung des <i>GYP</i> A-Promotors nach megakaryozytärer Differenzierung von humanen CD34+-Zellen.	111
Abbildung 3. 25: <i>GYP</i> A Expressionsver-änderung nach PRMT6-Manipulation	113
Abbildung 3. 26: PRMT6 Überexpression verändert die Expression erythroider und megakaryozytärer Marker.	115
Abbildung 3. 27: Inhibition von PRMT6 in K562-Zellen verändert die Expression erythroider Gene.....	117
Abbildung 3. 28: Auswirkungen des PRMT6-Inhibitors auf Protein-Ebene.....	118
Abbildung 3. 29: Die Inhibition von PRMT6 verstärkt die erythroide Differenzierung in CD34+- Zellen	120
Abbildung 3. 30: Inhibition von PRMT6 in CD34+-Zellen verändert die Expression erythroider Gene.....	120
Abbildung 3. 31: Veränderungen des <i>GYP</i> A-Promotor-Status und der Differenzierung nach Inhibitor-Behandlung	121
Abbildung 8. 1: PRMT6 Überexpression verändert die Expression erythroider und megakaryozytärer Marker	179

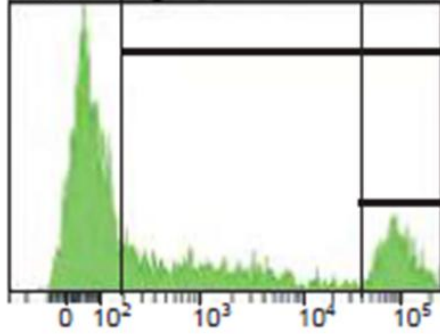
7.2 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1. 1: Tabellarische Darstellung der FAB-Klassifikation	22
Tabelle 2. 1: Übersicht aller verwendeter Geräte.	41
Tabelle 2. 2 Übersicht der verwendeten Primärantikörper.	43
Tabelle 2. 3 Übersicht aller für Western Blot verwendeter Sekundärantikörper.	44
Tabelle 2. 4 Übersicht aller für ChIP verwendeter Immunoglobuline.	44
Tabelle 2. 5: Reagenzien und Volumenangaben der PCR-Reaktion.	51
Tabelle 2. 6 Übersicht der verwendeten ChIP-Primer für die qRT-PCR Messung.	51
Tabelle 2. 7: PCR-Programm für die Analyse der ChIP-DNA.	52
Tabelle 2. 8 Übersicht der verwendeten Vektoren.	53
Tabelle 2. 9: Übersicht über den Ligationsansatz.	59
Tabelle 2. 10: Übersicht der verwendeten Antibiotika.	60
Tabelle 2. 11: Übersicht über den DNase-Verdau-Ansatz.	61
Tabelle 2. 12: Übersicht über die Volumenangaben der reversen Transkriptionsreaktion.	62
Tabelle 2. 13: Übersicht der Volumenangaben für die qRT-PCR-Reaktion.	63
Tabelle 2. 14: Übersicht des PCR-Programms der qRT-PCR.	63
Tabelle 2. 15: Übersicht der verwendeten Primer für die qRT-PCR-Messung.	63
Tabelle 2. 16: Charakteristika und Kulturbedingungen der verwendeten Zelllinien.	65
Tabelle 2. 17: Übersicht der verwendeten Zytokine für die CD34+-Expansion.	67
Tabelle 2. 18: Übersicht der verwendeten Zytokine und Chemikalien als Zusatz für die Differenzierung von CD34+-Zellen in Richtung Erythrozyten.	67
Tabelle 2. 19: Übersicht der verwendeten Zytokine und Chemikalien als Zusatz für die Differenzierung von CD34+-Zellen in Richtung der Thrombozyten.	68
Tabelle 2. 20: Übersicht der verwendeten Zytokine und Chemikalien als Zusatz für die Differenzierung von CD34+-Zellen zu Erythrozyten und Megakaryozyten-Vorläufer.	68
Tabelle 2. 21: Übersicht der Mengenangaben für die Transfektion von HEK293T17-Zellen für die Virusproduktion	69
Tabelle 2. 22: Übersicht der verwendeten FACS-Antikörper zur Oberflächen-Färbung.	71
Tabelle 2. 23: Übersicht der verwendeten Zytokine für die Kultivierung von Linien-depletierten murinen Progenitorzellen.	73
Tabelle 2. 24: Auflistung der Internet-Links zur UCSC-website für die Promotoranalyse.	74
Tabelle 3. 1: Übersicht der Expression verschiedener Differenzierungsmarker nach PRMT6- Manipulation	114

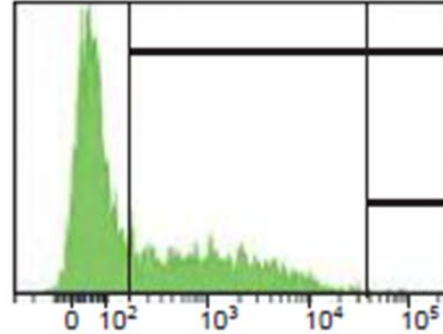
8 Anhang

A CD235a (GYPA), CD34+-Zellen in Ery/Mega-Medium

LeGOiG2 - Ctrl



LeGOiG2-PRMT6

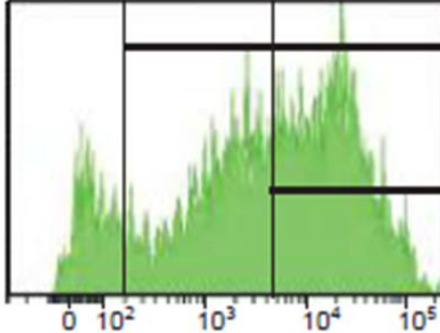


GYPA +

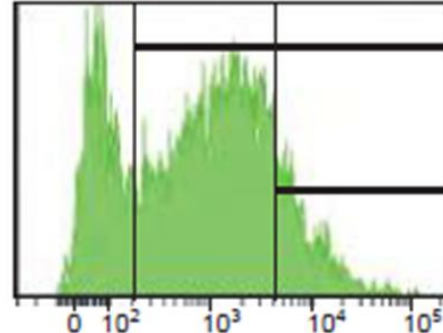
GYPA high

B CD71, CD34+-Zellen in Ery/Mega-Medium

LeGOiG2 - Ctrl



LeGOiG2-PRMT6

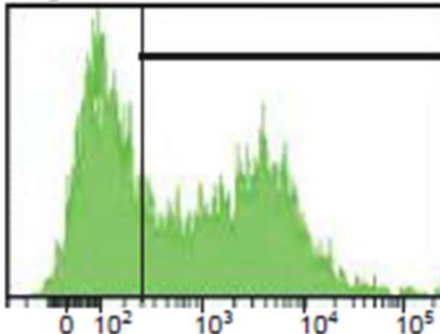


CD71+

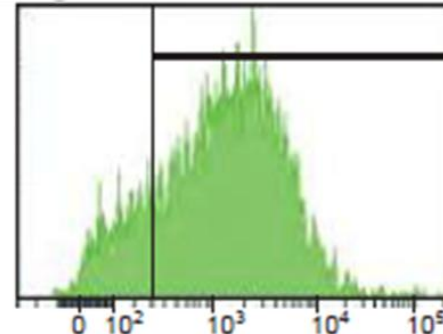
CD71 high

C CD61, CD34+-Zellen in Ery/Mega-Medium

LeGOiG2 - Ctrl



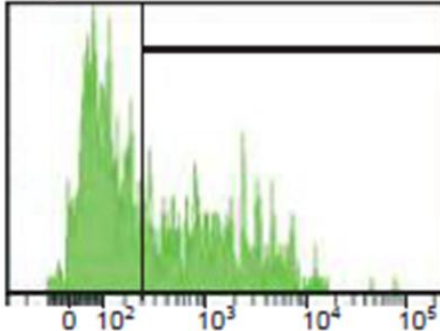
LeGOiG2-PRMT6



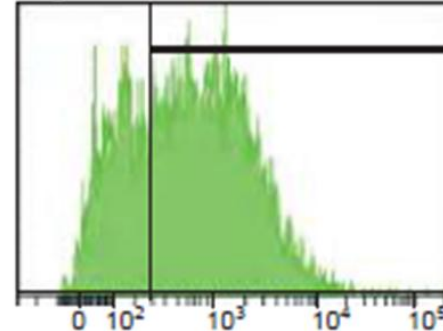
CD61+

D CD41, CD34+-Zellen in Ery/Mega-Medium

LeGOiG2 - Ctrl



LeGOiG2-PRMT6



CD41+

Abbildung 8. 1: PRMT6 Überexpression verändert die Expression erythroider und megakaryozytärer Marker. Humane CD34⁺-Zellen wurden isoliert und in Expansionsmedium kultiviert. Anschließend wurden die Zellen mit einem PRMT6-Überexpressionvektor und einem Kontrollvektor transduziert und nach zwei Tagen in ein Differenzierungsmedium überführt. Dieses Medium erlaubt eine Differenzierung in die megakaryozytäre, als auch in die erythroide Richtung. Die transduzierten GFP-positiven Zellen wurden nach einer Differenzierungszeit von 10 Tagen im FACS analysiert und die Oberflächenexpression verschiedener Marker gemessen. Es wird die Oberflächenexpression von CD235a (A), CD71 (B), CD61 (C) und CD41 (E) in einem Histogramm der GFP-positiven Zellen (transduzierte Zellen) dargestellt.

9 Publikationen und Posterpräsentationen

9.1 Publikationen

Herkt SC, Kuvardina ON, Herglotz J, Schneider L, Meyer A, Pommerenke C, Salinas-Riester G, Seifried E, Bonig H, Lausen J. Protein arginine methyltransferase 6 controls erythroid gene expression and differentiation of human CD34+ progenitor cells. *Haematologica* 2017

Kuvardina ON, **Herkt S**, Meyer A, Schneider L, Yillah J, Kohrs N, Bönig H, Seifried E, Müller-Tidow C, Lausen J. Hematopoietic transcription factors and differential cofactor binding regulate PRKACB isoform expression. *Oncotarget* 2017

Kohrs N, Kolodziej S, Kuvardina ON, Herglotz J, Yillah J, **Herkt S**, Piechatzek A, Salinas Riester G, Lingner T, Wichmann C, Bonig H, Seifried E, Platzbecker U, Medyouf H, Grez M, Lausen J. MiR144/451 Expression Is Repressed by RUNX1 During Megakaryopoiesis and Disturbed by RUNX1/ETO. *PLoS Genet.* 2016 Mar 18;12(3)

Kuvardina ON, Herglotz J, Kolodziej S, Kohrs N, **Herkt S**, Wojcik B, Oellerich T, Corso J, Behrens K, Kumar A, Hussong H, Urlaub H, Koch J, Serve H, Bonig H, Stocking C, Rieger MA, Lausen J. RUNX1 represses the erythroid gene expression program during megakaryocytic differentiation. *Blood.* 2015 Jun 4;125(23).

Kiehl S, **Herkt SC**, Richter AM, Fuhrmann L, El-Nikhely N, Seeger W, Savai R, Dammann RH. ABCB4 is frequently epigenetically silenced in human cancers and inhibits tumor growth. *Science Reports.* 2014 Nov 4;4:6899.

Courtial N, Mücke C, **Herkt S**, Kolodziej S, Hussong H, Lausen J. The T-cell oncogene Tal2 Is a Target of PU.1 and upregulated during osteoclastogenesis. *PLoS One.* 2013 Sep 26;8(9)

9.2 Posterpräsentationen

Herkt S, Hahn J, Courtial N, Kohrs N, Kuvardina ON and Jörn Lausen. The regulation of hematopoietic transcription factors by microRNAs, 4th UCT Science Day, Frankfurt (2012)

Herkt S, Hahn J, Courtial N, Kohrs N, Kuvardina ON and Lausen J. The regulation of hematopoietic transcription factor Tal1 by microRNAs
Retreat des Georg-Speyer-Hauses, Löwenstein (2012)

Herkt S, Herglotz J, Kuvardina ON, Kolodziej S, Hussong H, Jung M and Lausen J. The epigenetic function of the transcription factor RUNX1 as a target for molecular therapy, Retreat des Georg-Speyer-Hauses, Löwenstein (2013)

Herkt S, Herglotz J, Kuvardina ON, Kolodziej S, Hussong H, Jung M and Jörn Lausen. The epigenetic function of the transcription factor RUNX1 as a target for molecular therapy 5th UCT Science, Frankfurt 2013

Kolodziej* S and **Herkt S***. Evaluation of PRMT6 as a molecular target for an epigenetic therapy of leukemia, CGT Frankfurt (2014)

Herkt S, Wesely J, Hussong H, Jung M, Kohlscheen S, Herglotz J, Lausen J. The epigenetic function of the transcription factor RUNX1 as a target for molecular therapy, Summer school CGT Frankfurt, Bad Nauheim (2014)

Kuwardina ON, Herglotz J, **Herkt S**, Kolodziej S, Lausen J. Regulation of RUNX1 activity by protein arginine methyltransferase 6 // Modern Trends in Human Leukemia and Cancer, Wilsede (2014)

Herkt S and Lausen J. Influence of PRMT6 on hematopoiesis and evaluation as a therapeutic target, Beiratsbegehung Georg-Speyer-Haus, Frankfurt (2014)

Herkt S, Wesely J, Hussong H, Jung M, Kohlscheen S, Herglotz J, Lausen J. The epigenetic function of the transcription factor RUNX1 as a target for molecular therapy, Summer school CGT Frankfurt, Wiesbaden (2015)

Herkt S, Wesely J, Göllner S, Zörnig M, Jung M, Bönig H, Seifried E, Müller-Tidow C and Lausen J. The influence of PRMT6 on hematopoiesis and evaluation as a therapeutic target, 7th UCT Science Day, Frankfurt (2016)

10 Lebenslauf

Zur Person

Stefanie Herkt

Baseler Platz 8

60329 Frankfurt

Geboren am 18. April 1987 in Wetzlar

ledig

Promotion

03/2016 – heute

Fertigstellung der Promotion am DRK Blutspendedienst in Frankfurt a. M., wissenschaftliche Mitarbeiterin

01/2012 – 03/2016

Promotion im Georg-Speyer-Haus in Frankfurt a. M.

Arbeitsgruppe: Dr. rer nat. Jörn Lausen

Studium

10/2009 - 09/2011

Biologie an der Justus-Liebig-Universität Gießen

Abschluss: Master of Science

Masterthesis in Genetik:

„Epigenetische Regulation von tumorspezifischen Genen“

10/2006 - 09/2009

Biologie an der Justus-Liebig-Universität Gießen

Abschluss: Bachelor of Science

Bachelorthesis in Tierphysiologie:

„Untersuchung zu ausgewählten Aspekten des Sozialverhaltens an Goldstirnklammeraffen (*Ateles belzebuth hybridus*) im Zoo Frankfurt“

Schwerpunkte: Immunologie, Tierphysiologie und Ökologie

Schule

2003 - 2006

Oberstufengymnasium, Goetheschule Wetzlar,

Abschluss: allgemeine Hochschulreife

1997 - 2003

Kooperative Gesamtschule, Kestnerschule Wetzlar

1993 - 1997

Grundschule, Lotteschule Wetzlar

11 Danksagung

Zuallererst gilt mein Dank Prof. Dr. Beatrix Süß und Prof. Dr. Alexander Löwer von der TU Darmstadt für die Übernahme des Referates und Koreferates dieser Dissertation, die vorwiegend am Georg-Speyer Haus, sowie am DRK Blutspendedienst in Frankfurt, in der Arbeitsgruppe von Dr. Jörn Lausen angefertigt wurde.

Mein größter Dank gehört jedoch Dr. Jörn Lausen, der mir die Möglichkeit gegeben hat in seiner Arbeitsgruppe dieses interessante Thema zu bearbeiten und mit mir zusammen am Georg-Speyer-Haus und im Blutspendedienst erfolgreich zusammengearbeitet hat. Ich kann nur erneut erwähnen, dass ich ihm sehr dankbar für seine Unterstützung als Chef und als Mensch, während der Doktoranden-Zeit bin. Er war ein verständnisvoller und toller Chef, der auch trotz persönlich schwierigen Zeiten an mich geglaubt und immer hinter mir gestanden hat. Dieses Vertrauen hat schlussendlich zur meiner Publikation als Erst-Autor geführt, worauf ich sehr stolz bin. Außerdem hat er mir mit seinem Engagement und Ideen immer weiterhelfen können, wenn entschieden werden musste, in welche Richtung sich mein Projekt entwickelte. Nach den vielen Jahren arbeite ich noch immer gerne in seiner Arbeitsgruppe und bin glücklich ein Teil der „neuen“, sowie der „alten AG Lausen“ gewesen zu sein. So hat es mir wirklich Spaß gemacht die neue AG Lausen im Blutspendedienst zu etablieren und ich denke wir sind ein gutes Team geworden. Vielen Dank Jörn!

Weiterhin bin ich somit natürlich auch den Gruppenmitgliedern der „alten“, als auch der „neuen“ AG Lausen für ihre Unterstützung und die vielen lustigen Momente dankbar. Olginski und Helge, meine alten Büro-*Homies*, ich habe die netten Käffchen mit Tratsch entweder morgens oder nachmittags wirklich vermisst und bin froh, dass mir wenigstens noch Olginski geblieben ist. Bei diesen Kaffestunden entstanden immer gute Ideen, wenn es mal hieß *trouble shooting* für Versuche zu machen. Außerdem werde ich Jasmin, meine Lieblings-Schokoladendiebin und Horst a.k.a. Nicole nie vergessen. Wir haben uns die Mittagspausen mit grüner Soße und Kartoffeln als auch mit guten Gesprächsthemen versüßt und konnten auch fachlich gut miteinander diskutieren und uns gegenseitig vorantreiben. Weiterhin kann ich auch nur an alle anderen Doktoranden aus dem Georg-Speyer-Haus, wie Josi, Vicky, Anja, Sabrina, Sarah, Sandra, Steffen usw. meinen Dank aussprechen. Die Trinkhalalentouren und die Doktoranden-Meetings waren einfach unvergesslich!

Die Zeit mit den Gruppenmitgliedern im Blutspendedienst ist mir auch in Erinnerung geblieben. Annekarin und Lucas möchte ich für die Unterstützung während der Revision für meine Publikation danken. Ihr habt mir wirklich sehr geholfen alles fertig zu stellen. Annekarin, meine Lieblings-Zellkultur- und Urlaubspartnerin, sowie Film-Expertin und Lucas, mein Lieblings-Zyniker mit dem Blick fürs Optimistische und immer einem guten Tipp auf den Lippen, ihr

habt die „neue“ AG Lausen zu dem gemacht, was sie heute ist und wir werden hoffentlich auch noch weiterhin viel Spaß bei der Arbeit und privat zusammen haben. Außerdem möchte ich mich bei der AG Bönig für den netten Empfang im Blutspendedienst bedanken. Wir sind alle zusammen im Blutspendedienst ein gutes Team geworden und unterstützen uns gegenseitig.

Weiterhin bin ich natürlich auch meinen Eltern für die Unterstützung und die Ermutigung während des Studiums und auch der Doktorandenzeit sehr dankbar. Ohne Euch wäre das alles nicht möglich gewesen. Dabei will ich auch meinen Geschwistern Alex und Nico und natürlich insbesondere meiner Zwillingsschwester Tina danken. Meine liebste Tina, wir haben bis jetzt immer alles zusammen durchgestanden und natürlich auch unsere Doktorandenzeit und Studium. Ich bin sehr froh, dass wir beide immer wussten was der andere gerade durchmacht und wir uns gegenseitig immer stärken konnten. Außerdem bin ich dir und André, sowie deiner WG sehr dankbar, dass ihr mich so lieb in euer Heim aufgenommen habt, als ich einen Tapetenwechsel brauchte. Das werde ich euch nie vergessen!

Mein Dank gilt außerdem Julia, Lennart und der Gießen-Crew, da ihr für die notwendige abendliche Ablenkung während der Doktorandenzeit gesorgt habt, um den Stress von dem Pipettieren los zu werden, während ich noch in Gießen wohnte. Besonders möchte ich mich aber bei Julia für die Korrektur der Dissertation und die private Ablenkung danken. Du warst mir wirklich eine Stütze während dieser Zeit und unsere gemeinsam erlebten „Storys“ während des Studiums haben mich immer aufgeheitert und werden mich mein ganzes Leben lang begleiten.

Schlussendlich gebührt auch Amareza meinen Dank, der mich gegen Ende immer ertragen und ermutigt hat am Ball zu bleiben. Du hast mir die Zeit wirklich erleichtert und mir das Gefühl gegeben, dass du auf mich stolz bist. Diese Unterstützung von seinem Freund kann man sich nur wünschen. Überdies hast du mir die Eingewöhnung in Frankfurt wirklich erleichtert. Vielen Dank dafür!

12 Ehrenwörtliche Erklärung

Ich erkläre hiermit ehrenwörtlich, dass ich die vorliegende Arbeit entsprechend den Regeln guter wissenschaftlicher Praxis selbstständig und ohne unzulässige Hilfe Dritter angefertigt habe.

Sämtliche aus fremden Quellen direkt oder indirekt übernommenen Gedanken sowie sämtliche von Anderen direkt oder indirekt übernommenen Daten, Techniken und Materialien sind als solche kenntlich gemacht. Die Arbeit wurde bisher bei keiner anderen Hochschule zu Prüfungszwecken eingereicht.

Darmstadt, den

.....